

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

CIANOBACTERIAS PLANCTÓNICAS Y
CIANOTOXINAS EN EMBALSES ESPAÑOLES

DAVID CARRASCO GATA

Madrid, 2007

**Memoria presentada para optar al Grado de
Doctor en Ciencias Biológicas**

Fdo. David Carrasco Gata
Licenciado en Ciencias Biológicas

El director

Fdo. Antonio Quesada de Corral Profesor Titular Dpto. Biología Universidad Autónoma de Madrid
--



Índice

Índice



Introducción.....	1
Objetivos	8
Capítulo I.....	9
1. Introducción.....	10
1.1. Estructura subcelular y organización celular.....	11
1.2. Taxonomía de las cianobacterias.....	14
1.3. Ecología de las cianobacterias.....	16
1.4. Afloramientos de cianobacterias.	18
2. Objetivos.....	22
3. Materiales y Métodos.	23
3.1. Zona de Estudio.....	23
3.1.1. Embalse de Lozoya.....	23
3.1.2. Embalse de Río Sequillo.	24
3.1.3. Embalse de El Vellón.	24
3.1.4. Embalse de Santillana.....	25
3.1.5. Embalse de Valmayor.....	26
3.1.6. Embalse de San Juan.	26
3.1.7. Embalse de Picadas.	28
3.2. Toma de muestras.....	29
3.3. Determinación de Nutrientes.....	29
3.3.1. Análisis de amonio.	29
3.3.2. Análisis de nitrato y nitrito.	30
3.3.3. Análisis de fosfato.	31
3.3.4. Análisis de fósforo total.....	31
3.4. Determinación de variables físico-químicas.....	32
3.5. Determinación del contenido de Clorofila a.....	32
3.6. Determinación de clorofila a y grupos algales por métodos fluorométricos.....	32
3.7. Identificación de géneros cianobacterianos.....	34
3.8. Análisis estadístico.	34



4. Resultados.....	35
4.1. Embalse de Lozoya.....	35
4.1.1. Nutrientes.	35
4.1.2. Variables físico-químicas.	37
4.1.3. Clorofila a y fitoplancton.....	37
4.2. Embalse de Río Sequillo.	40
4.2.1. Nutrientes.	40
4.2.2. Variables físico-químicas.	43
4.2.3. Clorofila a y fitoplancton.....	44
4.3. Embalse de El Vellón.	45
4.3.1. Nutrientes.	47
4.3.2. Variables físico-químicas.	48
4.3.3. Clorofila a y fitoplancton.....	49
4.4. Embalse de Santillana.....	51
4.4.1. Nutrientes.	51
4.4.2. Variables físico-químicas.	54
4.4.3. Clorofila a y fitoplancton.....	56
4.5. Embalse de Valmayor.....	58
4.5.1. Nutrientes.	58
4.5.2. Variables físico-químicas.	60
4.5.3. Clorofila a y fitoplancton.....	63
4.6. Embalse de San Juan.	64
4.6.1. Nutrientes.	64
4.6.2. Variables físico-químicas.	67
4.6.3. Clorofila a y fitoplancton.....	69
4.7. Embalse de Picadas.	72
4.7.1. Nutrientes.	72
4.7.2. Variables físico-químicas.	74
4.7.3. Clorofila a y fitoplancton.....	77
4.8. Relaciones de clorofila a total y clorofila a de cianobacterias con los factores ambientales analizados.....	81
4.9. Especies de cianobacterias presentes en la Comunidad de Madrid.	85



4.10. Presencia de Afloramientos de cianobacterias en los embalses de la Comunidad de Madrid.....	94
4.11. Estado trófico de los embalses analizados.....	99
5. Discusión.....	100
Capítulo II.....	111
1. Introducción.....	112
1.1. Estructura química de las microcistinas.....	112
1.2. Síntesis de las microcistinas.....	114
1.3. Organismos productores.....	119
1.4. Función de las Microcistinas.....	121
1.5. Toxicidad de las microcistinas.....	122
1.6. Microcistinas en el ecosistema.....	123
1.7. Efectos de las microcistinas sobre los seres humanos.....	127
1.8. Legislación.....	128
2. Objetivos.....	130
3. Materiales y Métodos.....	131
3.1. Zona de Estudio.....	131
3.2. Toma de muestras.....	131
3.3. Determinación del contenido de clorofila a.....	132
3.4. Determinación de clorofila y grupos algales por métodos fluorométricos.....	132
3.5. Cultivo de la Cepa Microcystis aeruginosa UAM 247.....	132
3.6. Extracción y análisis de microcistinas.....	132
4. Resultados.....	135
4.1. Limite de cuantificación.....	135
4.2. Eficiencia de Extracción de las toxinas.....	136
4.3. Microcistina en las Embalses de la Comunidad de Madrid.....	137
4.3.1. Presencia de microcistinas en el Embalse de Lozoya..	138
4.3.2. Presencia de microcistinas en el embalse de Río Sequillo.	140
4.3.3. Presencia de microcistinas el embalse de El Vellón....	142



4.3.4. Presencia de microcistinas en el embalse de Santillana.	144
4.3.5. Presencia de microcistinas en el embalse de Valmayor	148
4.3.6. Presencia de microcistinas en el embalse de San Juan.	151
4.3.7. Presencia de microcistinas en el embalse de Picadas..	153
4.3.8. Variantes químicas de microcistinas en todos los embalses.	155
4.3.9. Relación entre microcistinas y clorofila.	157
4.3.10. Patrón temporal de aparición de microcistinas.	162
5. Discusión	165
Capítulo III	177
1. Introducción	178
1.1. Estructuras de las péptido sintetetasas.	178
1.2. Péptido sintetetasas responsables de la síntesis de microcistinas	181
1.3. Variantes químicas dentro de las microcistinas.	182
1.4. Diversidad genética de los potenciales productores de microcistinas en los afloramientos.	184
1.5. Diversidad Cianobacteria y microcistinas.	185
2. Objetivos	187
3. Materiales y Métodos.	188
3.1. Zona de Estudio.	188
3.2. Toma de muestras.	188
3.3. Análisis de especies cianobacterianas planctónicas potencialmente tóxicas presentes en el embalse de Santillana, extracción y análisis de microcistinas y análisis de parámetros ambientales.	188
3.4. Amplificación del gen <i>mcyB</i> , y análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción.	189
3.5. Análisis de Maldi-Tof	190
3.6. Realización de análisis quimio-taxonómico.	191



4. Resultados.....	192
4.1. Determinación del tamaño mínimo de la colonia de <i>Microcystis</i> necesaria para el análisis de Maldi-Tof.	192
4.2. Análisis de Microcistinas por HPLC.....	196
4.3. Especies cianobacterianas planctónicas presentes.....	197
4.4. Relación entre los tipos de microcistinas observadas y los parámetros ambientales.	299
4.5. Análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción.	201
4.6. Tipos de microcistinas presentes en colonias de <i>M. aeruginosa</i> analizadas por Maldi-Tof.	203
4.7. Diversidad de las colonias de <i>M. aeruginosa</i> en un afloramiento masivo.....	204
5. Discusión.	209
Capítulo IV	216
1. Introducción.....	217
1.1. Estructura química de la anatoxina-a y biosíntesis.....	218
1.2. Organismos productores.	220
1.3. Toxicidad de las anatoxinas.....	222
1.4. Anatoxinas en el ecosistema.....	223
1.5. Legislación.	225
2. Objetivos.....	226
3. Materiales y Métodos.	227
3.1. Zona de Estudio.....	227
3.1.1. Embalse de Arcos.	227
3.1.2. Embalse de Zujar.	228
3.1.3. Embalse de Cazalegas.	228
3.1.4. Embalse de Rosarito.	229
3.1.5. Embalse de Puentes Viejas.....	230
3.1.6. Embalse de El Atazar.	231
3.1.7. Embalse de Cuerda del Pozo.	232



3.2. Toma de muestras.....	233
3.3. Análisis de especies cianobacterianas planctónicas presentes potencialmente tóxicas.	233
3.4. Extracción y análisis de Anatoxina.	234
4. Resultados.....	237
4.1. Presencia de cianobacterias potencialmente productoras de anatoxina-a en embalses españoles.	237
4.2. Presencia de anatoxina-a en embalses españoles.	240
4.2.1. Presencia de anatoxina en el embalse de Santillana. ...	240
4.2.2. Presencia de anatoxina-a en el embalse de Rosarito. ..	243
5. Discusión	245
Capítulo V.....	250
1. Introducción.....	251
1.1. Estructura química de la cilindropermopsina y biosíntesis.....	251
1.2. Organismos productores.	253
1.3. Toxicidad de la cilindropermopsina.....	255
1.4. Cilindropermopsina en el ecosistema.	256
1.5. Legislación.	257
2. Objetivos.....	258
3. Materiales y Métodos.	259
3.1. Zona de Estudio.....	259
3.2. Toma de muestras.....	259
3.3. Determinación de parámetros químicos.	259
3.4. Determinación de parámetros químicos.	259
3.5. Análisis biológicos.	260
3.6. Ensayo de toxicidad.....	260
3.7. Extracción y análisis de cilindropermopsina.	260
3.8. Relación entre cilindropermopsina intracelular y extracelular y como afectan los factores ambientales.	262
4. Resultados.....	264
4.1. Características Ambientales.	264
4.2. Estructura de la comunidad fitoplanctónica.	265



4.3. Toxicidad de las muestras.....	267
4.4. Concentraciones de cilindropermopsina.	268
4.5. Relación entre cilindropermopsina intracelular y extracelular y como afectan los factores ambientales	269
5. Discusión	273
Discusión.....	277
Conclusiones	280
Bibliografía	283
Anexo.....	I



INTRODUCCIÓN



Introducción

Las cianobacterias son bacterias Gram-negativas capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica. Estos organismos tienen importancia en aspectos relacionados con el ser humano, ya que por ejemplo las especies fijadoras de nitrógeno contribuyen a la fertilidad del suelo y el agua, aunque también en múltiples ocasiones son responsables de disminución de la calidad de las aguas superficiales (Bartram y col., 1999).

Una característica importante que presentan las cianobacterias y que es común a otros organismos tanto procariontes, como eucariontes (especialmente hongos y plantas) es que poseen un metabolismo secundario muy activo. En general se considera metabolismo secundario, a todo aquel metabolismo que no está implicado en la glicólisis, el ciclo de Krebs, y en la fotosíntesis y rutas asociadas, que es considerado metabolismo primario y que sería idéntico en todos los organismos (con la salvedad de la fotosíntesis) (Seigler 1998). Como podemos observar, la utilización de una definición por exclusión, hace que la idea de metabolismo secundario sea laxa, incluyendo a gran número de compuestos producidos por los organismos que presentan un metabolismo secundario activos.

Algunos de los compuestos producidos por este metabolismo secundario se caracterizan por presentar efectos nocivos sobre otros organismos, ya sea sobre los que compiten con ellos de manera natural en su ecosistema, u otros que en principio sólo entrarían en contacto de manera accidental. Esta capacidad de producir compuestos tóxicos no la presentan todas las cianobacterias, aunque algunos de los géneros potencialmente productores están ampliamente distribuidos a lo largo de cuerpos de agua dulce de todo el mundo.



Introducción

Los compuestos tóxicos producidos por las cianobacterias son químicamente diversos, así que la clasificación de los diferentes tipos de toxinas se ha realizado en función del efecto que producen sobre los animales, o en órganos derivados de animales. Según esta clasificación, existen 5 clases de toxinas producidas por las cianobacterias: hepatoxinas, neurotoxinas, citotoxinas, dermatotoxinas y endotoxinas

⇒ **Hepatotoxinas:** Son el tipo de cianotoxinas más común (Sivonen y Jones 1999).

Se han encontrado dos familias de compuestos que presentan efectos tóxicos sobre el hígado, son las microcistinas y nodularinas, son péptidos de pequeño tamaño (7 aminoácidos en el caso de la microcistina, y 5 en el caso de las nodularinas) que poseen varios aminoácidos raros. Tienen como órgano diana el hígado (Dawson 1998).

⇒ **Neurotoxinas:** Químicamente se han encontrado tres grandes grupos de toxinas producidas por las cianobacterias y que son capaces de mostrar efectos tóxicos a nivel neuronal, o en la interacción entre las neuronas y el músculo. Estas son: Anatoxina-a, anatoxina-a (s) y saxitoxinas. Las dos primeras toxinas son producidas exclusivamente por cianobacterias, mientras que las últimas también son producidas por los dinoflagelados (mareas rojas) ((Devlin y col., 1977), (Matsunaga y col., 1989) y (Sivonen y Jones 1999)).

⇒ **Citotoxinas:** Dentro de este grupo encontramos un único tipo de toxinas las cilindrospermopsinas. Estas toxinas fueron definidas en un primer momento como hepatotoxina, pero estudios posteriores han mostrado que son capaces de causar daños en múltiples órganos y sistemas: hígado, riñones, corazón, estómago, glándulas adrenales, sistema vascular y linfático (Falconer y Humpage 2006).



- ⇒ **Dermatotoxinas:** se encuentran entre las toxinas menos estudiadas, sus efectos se han visto sobre todo asociados a cianobacterias marinas, y se conoce muy poco de su modo de actuación y de su toxicidad se han definido dos grupos químicamente diferentes: aplisiatoxinas y lingbiatoxinas. Tienen efectos inflamatorios y son potentes promotores de tumores y activadores de la protein kinasa C (Sivonen y Jones 1999).
- ⇒ **LPS:** los LPS (lipopolisacáridos), compuestos que son producidos por todas las cianobacterias, puesto que los LPS, son constituyentes de las paredes celulares de las bacterias *Gram* negativas. Dadas las similitudes entre las bacterias *Gram* negativas y las cianobacterias todas las especies de cianobacterias presentan LPS, aunque hasta el momento todos los LPS estudiados presentan una toxicidad muy inferior al de otras bacterias *Gram* negativas como las que presenta el género *Salmonella* (Sivonen y Jones 1999).

Como hemos indicado con anterioridad no todas las cianobacterias son capaces de producir compuestos tóxicos, de hecho para los 4 primeras clases de toxinas el número de géneros que han presentado cepas productoras es muy limitado. Se consideran géneros potencialmente tóxicos aquellos en los cuales se han encontrado al menos una especie capaz de producir toxinas (Codd y col., 2005a). Bajo estas premisas se han encontrado al menos 18 géneros de cianobacterias potencialmente tóxicos (Tabla 0.1), entre ellos cabe destacar por su amplia distribución en los cuerpos de agua europeos tres de ellos: *Anabaena*, *Planktothrix* y *Microcystis* que son probablemente los tres géneros que presentan una mayor probabilidad de producir afloramientos tóxicos (Sivonen y Jones 1999). Aunque cabe indicar que existen claras diferencias entre estos géneros en los tipos de toxinas producidas y en la probabilidad que presentan cada uno de estos géneros de presentar cepas tóxicas.



Géneros	Tipo de toxina Producida
<i>Anabaena</i>	Microcistinas, anatoxina-a , anatoxina-a (s), saxitoxinas y cilindrospermopsina
<i>Anabaenopsis</i>	Microcistinas
<i>Aphanizomenon</i>	Anatoxina-a, saxitoxinas, y cilindrospermopsina
<i>Cylindrospermopsis</i>	Saxitoxinas y cilindrospermopsina
<i>Hapalosiphon</i>	Microcistinas
<i>Lyngbya</i>	Saxitoxinas, Lingbiatoxina-a y Apliatoxina
<i>Microcystis</i>	Microcistinas
<i>Nodularia</i>	Nodularinas
<i>Nostoc</i>	Microcistinas
<i>Oscillatoria</i>	Microcistinas, Anatoxina-a, Lingbiatoxina-a y Apliatoxina
<i>Phormidium</i>	Anatoxina-a
<i>Planktothrix</i>	Microcistinas y Saxitoxin
<i>Raphidiopsis</i>	Anatoxina-a y cilindrospermopsina
<i>Schizothrix</i>	Lingbiatoxina-a y Apliatoxina
<i>Synechocystis</i>	Microcistinas
<i>Umezakia</i>	Anatoxina-a y cilindrospermopsina
<i>Woronichinia</i>	Microcistinas

Tabla 0.1. Géneros cianobacterianos potencialmente productores de toxinas. Extraído de (Codd y col., 2005a).

Existen cuatro formas principales de exposición de estas toxinas en los seres humanos: por ingestión oral, por contacto epidérmico, y finalmente una forma de entrar en contacto poco probable pero que ha ocurrido que es la inyección intraperitoneal (Azevedo y col., 2002), y por inhalación que está muy limitada a las exposiciones relacionadas con los deportes acuáticos (Tabla 0.2).



Introducción

Ruta de Exposición	Año	Localización	Casos	Toxina presente	Síntomas
Agua de Bebida	1975	EEUU	Cerca de 5000	No analizada	Gastroenteritis
	1979	Australia	149	Cilindrospermopsina	Gastroenteritis, Daño en el riñón, Daño hepático e intestinal
	1981	Australia	25000 personas	Microcistina	Daño hepático
	72-90	China	Análisis estadístico	Microcistina	Cáncer de hígado primario
	1988	Brasil	2000 incluyendo 88 muertes	No analizada	Gastroenteritis
Aguas Recreativas	1989	Escocia	10	Microcistina	Gastroenteritis, Garganta irritada, Ampollas en la boca, Dolor abdominal, Fiebre, Vómitos, Consolidación pulmonar
	1995	Australia	777	Hepatotoxinas	Gastroenteritis, Síntomas similares a la gripe, Llagas en la boca, Fiebre, Irritación en ojos y orejas
	1996	Escocia	11	Microcistinas	Erupción, Fiebre
Hemodiálisis	1974	EEUU	23	LPS	Fiebre, Mialgia, Resfriado, Vómitos
	1996	Brasil	117 (50 muertos)	Microcistinas	Problemas Visuales. Nauseas, Vómitos, Daño hepático

Tabla 0.2. Incidentes sobre la salud de seres humanos en los que se han visto involucrados cianobacterias o los compuestos que ellas producen. (Extraído de (Codd y col., 2005b)).



Cuando analizamos los síntomas que se han asociado a la presencia de cianobacterias y de sus toxinas, podemos observar que muchos de ellos son comunes a otras dolencias e intoxicaciones, lo que dificulta la atribución médica de la causa de la dolencia a la presencia de cianobacterias. Además, se da la circunstancia de que el conocimiento de las patologías relacionadas con la toxicosis por cianobacterias no está ampliamente distribuido por los servicios médicos. Otra de las cosas que podemos observar es que únicamente tres de las toxinas que son producidas por cianobacterias se han implicado con problemas sobre los seres humanos, estos son las microcistinas, la cilindrospermopsina y los LPS, mientras que las neurotoxinas se han asociado sobre todo a problemas con animales de granja o de compañía (Codd y col., 2005b).

A lo largo de esta tesis vamos a estudiar la presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas y de tres cianotoxinas en embalses españoles. En el primer capítulo analizaremos la importancia que presentan las cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas en 7 embalses que sirven como fuentes de agua potable a la mayor parte de la Comunidad de Madrid, en el segundo y en el tercero estudiaremos la presencia de microcistinas, posiblemente la toxina de cianobacterias más importante en esos siete embalses, y analizaremos el cambio de las estirpes productoras en uno de los embalses analizados respectivamente. En el cuarto capítulo analizaremos cómo de importante es la anatoxina-a en España, y finalmente en el quinto capítulo mostraremos la presencia de cilindrospermopsina en un embalse español causada por *Aphanizomenon ovalisporum*.



Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es estudiar la importancia de las cianobacterias potencialmente tóxicas y sus toxinas en los embalses de la españoles. Como objetivos secundarios tenemos:

- ⇒ Analizar la presencia e importancia de las cianobacterias potencialmente tóxicas en la población fitoplanctónica durante el periodo en que la concentración de clorofila en los lagos y embalses de la zona templada suele ser mas elevada.
- ⇒ Estudiar la concentración de microcistinas, anatoxina-a y de los potenciales productores en los embalses de la Comunidad de Madrid, región donde los embalses son un recurso estratégico fundamental como fuente de agua potable.
- ⇒ Determinar la concentración de cilindrospermopsina y e identificar a su posible productor en el embalse de Arcos.



CAPÍTULO I

CAPÍTULO I



Cianobacterias planctónicas en embalses de la Comunidad Autónoma de Madrid

1. Introducción

Hasta el momento los datos sobre la abundancia de las cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas en los embalses de nuestra región son muy escasos. Esto hacía recomendable el realizar un estudio sobre la presencia de estos organismos en nuestros embalses, de modo que sirviera de referencia a futuros estudios o como punto de partida a un posible procedimiento de monitorización de nuestros embalses.

Las cianobacterias también conocidas como cianofíceas, algas verde-azuladas o cianoprocariotas es el grupo de procariotas fotosintéticos más relevante en diversidad y biomasa. Son las únicas bacterias fotosintéticas que poseen clorofila *a* y que por lo tanto son capaces de desarrollar fotosíntesis oxigénica. Poseen un sistema muy similar al de los eucariotas fotosintéticos, con dos fotosistemas similares a los de estos organismos, el fotosistema I y el fotosistema II, de hecho fueron los primeros organismos que desarrollaron fotosíntesis oxigénica. Se han descubierto fósiles con estructuras similares a las cianobacterias actuales con una edad aproximada de 3500 millones de años (Bisby 1995), lo que indicaría su antigüedad evolutiva. A pesar de esta antigüedad, cabe destacar que dentro de las “algas” las cianobacterias conforman el grupo que presenta el menor número de especies (Bisby 1995), aunque el concepto de especie, como en todos los organismos que no poseen reproducción sexual, depende del sistema de clasificación utilizado. A este respecto existen dos sistemas de clasificación básicos para cianobacterias: el sistema bacteriológico y el sistema botánico, aunque en los últimos años se han intentado unificar ambos sistemas.



1.1. Estructura subcelular y organización celular.

La célula vegetativa se caracteriza por presentar un protoplasto rodeado por una envuelta similar a la que presentan las bacterias Gram-negativas. En ocasiones, la pared celular se rodea de una cápsula o vaina mucilaginosa que facilita la agregación de las células y puede servirles de protección contra la desecación. En la parte central se encuentra el material genético, formado por un cromosoma circular de ADN (Makino y Tsuzaki 1971) y los ribosomas.

La mayor parte de este protoplasto se encuentra ocupado por tilacoides, que como en el caso de los que se encuentran en los cloroplastos, contienen los principales componentes del aparato fotosintético: pigmentos, centros de reacción y cadena de transporte electrónico (Figura I.1). Una característica fundamental de estos organismos es la presencia, entre los pigmentos antena, de una familia de compuestos capaces de captar longitudes de onda de la luz que normalmente no son utilizadas por otros organismos fotosintéticos (Figura I.2). Estos compuestos son las ficobilinas, de las cuales las tres más importantes son la ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina, que les permiten utilizar la gama verde del espectro luminoso.

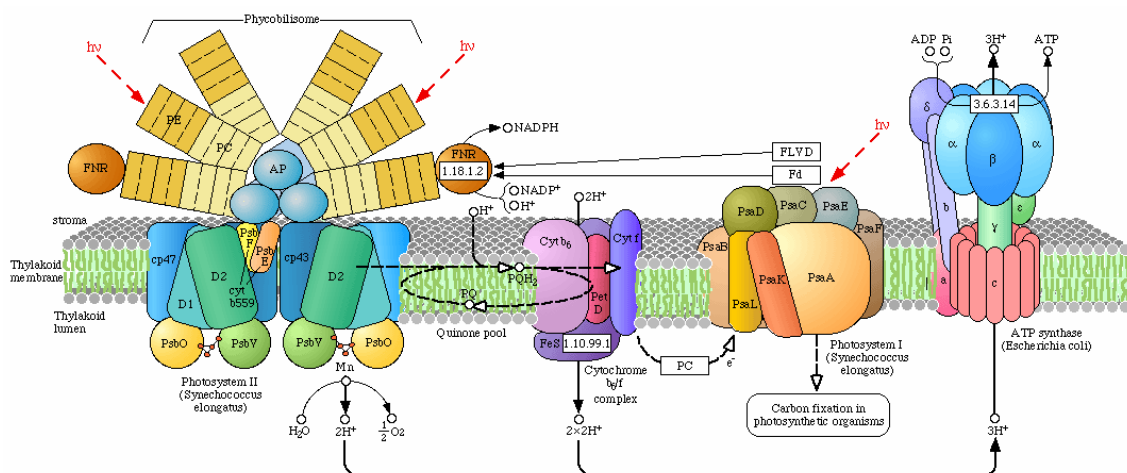


Figura I.1. Cadena fotosintética presente en las cianobacterias (extraído de <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map00195.html>).

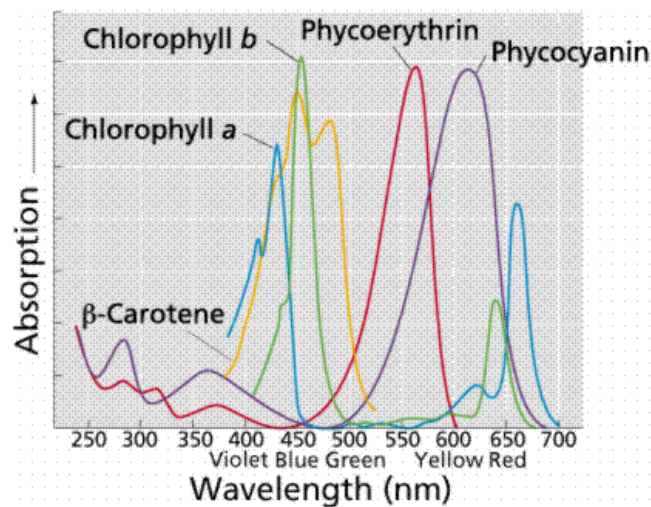


Figura I.2. Espectro de absorción de los principales pigmentos fotosintéticos. Extraído de (Purves y col., 1992)).

Dispersos en el citoplasma se encuentra una serie de inclusiones y sustancias de reserva. Los más importantes son los gránulos de polifosfato, gránulos de glucógeno; gránulos de cianoficina, glóbulos lipídicos y los carboxisomas. Aparte de estos gránulos que se encuentran en todas las cianobacterias, algunas de ellas presentan otro tipo de estructuras, las vesículas de gas. Éstas últimas son también inclusiones citoplasmáticas de forma cilíndrica que pueden llenarse de gas permitiendo a las cianobacterias modificar su densidad celular. Estas vesículas confieren a las cianobacterias planctónicas una importante ventaja ecológica sobre otros elementos de la población fitoplactónica ya que les permite modificar su posición vertical en la columna de agua, con lo que pueden adquirir nutrientes en las zonas profundas de la columna de agua o energía fotosintética en la superficie de ésta (Walsby 1987).

Las cianobacterias filamentosas que pertenecen a las secciones IV y V de la taxonomía bacteriológica y a los órdenes Oscillatoriales, Nostocales y Stigonematales de la taxonomía botánica, presentan diferenciación celular, mostrando tipos celulares diferentes a estas células vegetativas, que son los heterocistos y acinetos (Figura I.3).

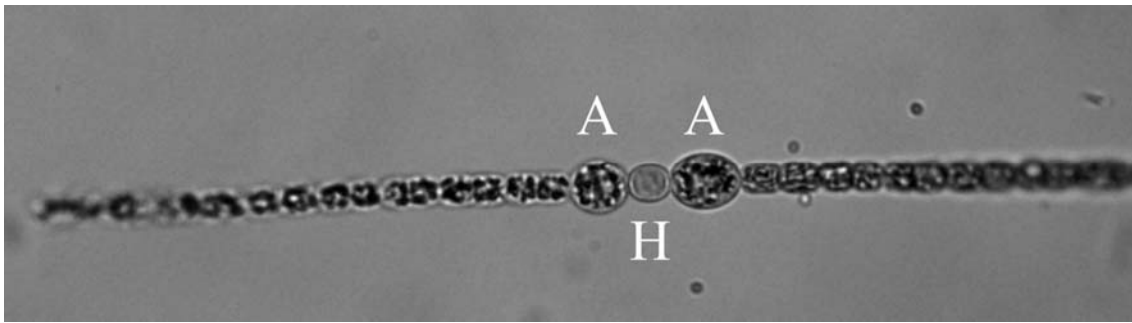


Figura I.3. Fotografía de *Aphanizomenon aphanizomenoides* 400x. Se muestran en un mismo filamento A = acinetos y H = heterocisto

Los **heterocistos** son células diferenciadas que presentan como función fundamental la fijación biológica de nitrógeno. Normalmente son de mayor tamaño que las células vegetativas. La fijación biológica del nitrógeno es realizada por la enzima nitrogenasa y consiste en la reducción del nitrógeno molecular a amonio, molécula nitrogenada que puede ser incorporada en la célula a compuestos orgánicos. Esta enzima tiene un gran inconveniente, su sensibilidad al oxígeno molecular, esto hace necesario que para que esta enzima funcione se ha de reducir forzosamente la tensión parcial de oxígeno en las proximidades de la enzima. Es por ello por lo que algunas cianobacterias han desarrollado diversas estrategias que les permiten fijar nitrógeno, en un sistema tan rico en oxígeno como es nuestro planeta (Adams 2000). Una de las estrategias más extendidas dentro del *Filum* ha sido el desarrollo de estos heterocistos, como lugar en el que diferentes mecanismos aseguran una muy baja concentración de oxígeno.

El otro tipo celular diferente a las células vegetativas son los **acinetos**. Este tipo celular es una forma de resistencia que aparece cuando las condiciones ambientales son desfavorables. Tienen la capacidad de germinar después de una larga exposición al frío, desecación y limitación de fósforo (Herdman 1989). Los acinetos se forman a partir de las células vegetativas por acumulación de nuevas capas de materiales polisacáridos en el lado exterior de la pared celular y por la formación de acúmulos de reserva en el protoplasma (fundamentalmente gránulos de cianoficina y de glucógeno). También ocurren otros cambios fisiológicos y químicos como el incremento del contenido de



ARN, la desaparición de las actividades biosintéticas, la fotosíntesis y los gránulos de polifosfato (Huber 1985). Cuando las condiciones ambientales mejoran, los acinetos pueden germinar dando lugar a un nuevo filamento.

1.2. Taxonomía de las cianobacterias.

La clasificación de cianobacterias como ocurre en todo el mundo procarionte es problemático. Dado que en un primer momento (antes de los estudios de microscopia electrónica), las cianobacterias al igual que las bacterias fueron clasificadas como plantas, existen dos sistemas taxonómicos diferentes, uno botánico y otro bacteriológico. Aunque en los últimos años con el apoyo de las herramientas genéticas se está intentando revisar y unificar ambos sistemas de clasificación.

El sistema bacteriológico (Rippka y col., 1979) divide a las cianobacterias en cinco secciones en función de la organización y el modo de división que presentan los diferentes organismos, estas secciones son:

- ✦ Sección I (orden Chroococcales en el sistema botánico). Engloba las cianobacterias unicelulares que se multiplican por fisión binaria o gemación. Las células tienen forma esférica, cilíndrica u ovalada. Ej. *Synechocystis*.
- ✦ Sección II (orden Pleurocapsales). Agrupa a las cianobacterias unicelulares que pueden formar colonias y que se multiplican por fisión múltiple, dando lugar a células hijas de menor tamaño llamadas baeocitos. Ej. *Dermocarpella*.
- ✦ Sección III (orden Oscillatoriales en el sistema botánico). Incluye cianobacterias filamentosas sin heterocistos, que se dividen en un único plano. La multiplicación se produce por rotura de filamentos y en algunos géneros también mediante la germinación de acinetos, o la formación de hormogonios. Ej. *Planktothrix*.
- ✦ Sección IV (orden Nostocales en el sistema botánico). Dentro de esta sección nos encontramos a las cianobacterias filamentosas con heterocistos, que se dividen en un solo plano y se reproducen mediante rotura de tricomas,



formación de hormogonios o germinación de acinetos. Ej. *Anabaena*, *Aphanizomenon*.

- ⇒ Sección V (orden Stigonematales en el sistema botánico). Formadas por las cianobacterias filamentosas con heterocistos en las que la división celular se realiza en dos planos, dando lugar a tricomas ramificados. La reproducción se realiza como en las dos secciones anteriores. Ej. *Mastigocladus*.

La aproximación botánica (p.e. (Geitler 1932); (Komarek y Anagnostidis 1989)) se basa fundamentalmente en las características morfológicas que estos organismos presentan como son: los planos de división celular, presencia de vaina alrededor del individuo o la colonia, pigmentación, medidas del tricoma y de la célula, forma celular y en menor medida en las características ecofisiológicas que presentan las especies. Esta aproximación utiliza las pautas del código botánico de nomenclatura. Según esta taxonomía botánica se distinguen 4 órdenes diferentes, estos son:

- ⇒ Chroococcales. Engloban a las cianobacterias unicelulares tanto a las que forman colonias como a las que no. Dentro de este orden se distinguen 7 familias, que se agrupan en función del tipo de célula, la envuelta que presentaban y el tipo de reproducción: Gloeobacteraceae (p.e. *Gloeobacter*), Synechococcaceae (p.e. *Synechococcus*), Merismopediaceae (p.e. *Merismopedia*), Myrocystaceae (p.e. *Microcystis*), Entophysalidaceae (p.e. *Siphononema*), Hydrococcaceae (p.e. *Hydrococcus*), Chamaesiphonaceae (p.e. *Chamaesiphon*), Dermocarpellaceae (p.e. *Cyanocystis*), Xenococcaceae (p.e. *Xenococcus*), Hyellaceae (p.e. *Pleurocapsa*).
- ⇒ Oscillatoriales. Engloban a las bacterias filamentosas sin heterocistos, ni acinetos. Este orden engloba 6 familias: Pseudoanabaeneceae (p.e. *Pseudoanabaena*), Schizotrichaceae (p.e. *Schizothrix*), Borziaceae (p.e. *Borzia*), Phormidiaceae (p.e. *Phormidium*), Gomontiellaceae (p.e. *Hormoscilla*) y Oscillatoriaceae (p.e. *Oscillatoria*).



- ⇒ Nostocales. Engloba a las bacterias filamentosas que presentan heterocistos y acinetos, pero no verdaderas ramificaciones. Engloba a 4 familias que se diferencian por la morfología de las colonias, los filamentos, diferenciación y posición de heterocistos y acinetos. Las familias són: Scytonemataceae (p.e. *Scytonema*), Microchaetaceae (p.e. *Microchaete*), Rivulariaceae (p.e. *Gloeotrichia*), Nostocaceae (p.e. *Anabaena*).
- ⇒ Stigonematales. Dentro de este orden se encuentran las cianobacterias que presenta heterocistos y talos morfológicamente complicados (ramificaciones). Dentro de este orden podemos diferenciar 8 familias que tienen como características definitorias fundamentales: la estructura de los talos, tipo de ramificación, posición de los heterocistos y procesos reproductivos. Las familias son: Chlorogloeopsaceae (p.e. *Chlorogloeopsis*), Capsosiraceae (p.e. *Capsoria*), Stigonemataceae (p.e. *Stigonema*), Fischerellaceae (p.e. *Fischerella*), Bourzinemataceae (p.e. *Borzinema*), Loriellaceae (p.e. *Geitleria*), Nostochopsaceae (p.e. *Mastigocoleus*), Mastigocladaceae (p.e. *Mastigocladus*).

1.3. Ecología de las cianobacterias.

Las cianobacterias son ubicuas, se han encontrado desde los polos, hasta los desiertos más cálidos. Esto es debido a la gran plasticidad ecológica que presentan (Whitton y Potts 2000). Este grupo de algas pueden llegar a dominar el plancton de lagos y océanos tropicales; también son características de otros ecosistemas acuáticos como ríos, fuentes termales etc. Junto con estos ecosistemas acuáticos, también es posible encontrar cianobacterias adaptadas a ambientes terrestres, llegando a ser muy abundantes en suelos tropicales y en suelos saturados de agua por ejemplo en jardines encharcados (Figura I.4).

Las cianobacterias que viven en el medio acuático se pueden clasificar ecológicamente en dos grupos, planctónicas y bentónicas. Las primeras se caracterizan



por vivir libremente en la superficie o en la columna de agua, mientras que las segundas viven en el fondo o asociadas a un sustrato.

Las cianobacterias juegan un papel muy importante como colonizadores primarios ya que incorporan materia orgánica al suelo y previenen la erosión. Así mismo son la población dominante en ambientes inhóspitos como cráteres volcánicos, fuentes termales, charcas y lagos alpinos o polares y sistemas lacustres y fluviales altamente contaminados (por vertidos orgánicos o inorgánicos) (Gibson y Smith 1982). Gracias a la capacidad fijadora de N_2 que presentan algunas cianobacterias, son a menudo los únicos habitantes de aguas extremadamente deficientes en nitrógeno.



Figura I.4: Foto de *Nostoc* creciendo subaerofíticamente. (Foto cedida por A. Quesada)

En los ambientes terrestres, como hemos indicado con anterioridad las cianobacterias son una parte importante de la microflora. Predominan en los ambientes microaerobios y próximos al pH neutro de los suelos de arrozales anegados (Roger y Kolasooriya 1980). En los suelos polares de la tundra las cianobacterias abundan con un papel importante como productores primarios e incorporadores de N_2 atmosférico (Oliver y Ganf 2000). Las rocas de la Antártida son otro medio extremo en el que aparecen las cianobacterias, así como en zonas desérticas junto a líquenes y algas.

Finalmente, hay que destacar que las cianobacterias son capaces de formar relaciones simbióticas con gran cantidad de organismos: hongos, algas verdes,



diatomeas, musgos, angiospermas, protozoos, etc. (Whitton y Potts 2000). En estas asociaciones la cianobacteria excreta amonio para el hospedador, excepto en las asociaciones con hongos (líquenes), en las que aporta glucosa. El hospedador, a cambio le proporciona un sustrato donde desarrollarse y los metabolitos necesarios para el crecimiento. Las cianobacterias simbióticas tienen mayor actividad nitrogenasa y mayor porcentaje de heterocistos que las de vida libre y bajos niveles de glutamina sintetasa enzima necesaria para la incorporación del amonio a los aminoácidos.

1.4. Afloramientos de cianobacterias.

El crecimiento de un organismo depende de su habilidad para optimizar la obtención de recursos, la eficiencia con que utiliza esos recursos y cómo minimiza las pérdidas. Por ello es improbable que un organismo tenga la flexibilidad metabólica que le permita dominar bajo todas las condiciones ambientales. De esta manera cuando domina en un momento y lugar, podemos suponer que las características que ese organismo presenta son especialmente adecuadas para las condiciones en las que se encuentra. Cuando se dan estas condiciones, en ocasiones las cianobacterias producen acumulaciones masivas de biomasa distribuida en la superficie o en la columna de agua, a estas acumulaciones masivas se las denomina afloramientos, o el término en inglés 'blooms'.

El término afloramiento está pobremente definido, pero en general una definición aceptada es: "incremento de biomasa fitoplanctónica significativamente superior a la media que presenta el ecosistema donde se encuentra", bajo esta definición cualquier cuerpo de agua independientemente de su estado trófico puede presentar afloramientos. Esta definición es tan abierta que en aguas dulces con usos de aguas potables o recreacionales suelen hacerse una modificación de la definición por la cual se describe un afloramiento en función de la concentración celular que puede causar daños a los seres humanos. En este caso estaríamos hablando de afloramiento cuando la concentración de clorofila *a* sea superior de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, concentración que equivale aproximadamente a 20000 células por mL. Cuando las cianobacterias dominan ese



afloramiento hablamos de afloramiento de cianobacterias o cianobacteriano (Oliver y Ganf 2000).

Los afloramientos cianobacterianos no son un fenómeno nuevo y se han encontrado pruebas de su existencia en tiempos remotos (Reynolds y Walsby 1975), pero no ha sido hasta la actualidad en que su impacto sobre la calidad del agua se ha tenido más en cuenta, especialmente debido a la producción de toxinas. Si añadimos además el dato de que existe una correlación entre la cantidad de fósforo y la importancia de las cianobacterias dentro de la población fitoplanctónica general (Watson y col., 1997). Parece indicar que a medida que la eutrofización de los lagos y embalses ha aumentado, en muchos casos debido a causas antrópicas, se ha incrementado la probabilidad de que se desarrollen afloramientos de microalgas en general y de cianobacterias en particular.

No todos los autores están de acuerdo sobre las características que promueven la formación de los afloramientos. Se han propuesto diversas causas y probablemente la razón de que aparezcan sea una mezcla de todas ellas y algunas otras que aun no han sido definidas. Esta multitud de variables que estarían interactuando y promoverían la aparición de un afloramiento sería la razón por la cual en la actualidad no existe ninguna forma eficiente de predecir la formación de un afloramiento. Las principales razones que se han publicado para explicar la aparición de los afloramientos son:

- ↻ Las vesículas de gas que les permiten regular su posición en la columna de agua. Esta propiedad les da una ventaja importante sobre otras micro-algas, especialmente en aguas profundas donde la intensidad de la turbulencia es baja (Oliver 1994).
- ↻ Las importantes diferencias en los complejos antena de los fotosistemas y en la composición de los pigmentos fotosintéticos que estos organismos presentan en comparación con otros miembros del fitoplancton. A mediados de los años 80 se defendía que las cianobacterias tenían bajos requerimientos lumínicos pero en la actualidad no está claro que esta diferencia se traduzca en diferentes respuestas a



cambios en la intensidad lumínica, longitud del día y composición espectral (Oliver y Ganf 2000). La energía necesaria para sintetizar las vesículas de gas en las cianobacterias podría ser suficiente para favorecer a las algas verdes bajo condiciones de baja luz.

- ↗ Durante los años 80 también se defendía que la temperatura del agua entre 25-40° C (Robarts y Zohary 1987) favorecía a las cianobacterias. No obstante, en la actualidad no hay evidencias que soporten la hipótesis que las cianobacterias capaces de formar afloramientos prefieran temperaturas superiores a otras micro-algas (Oliver y Ganf 2000), de hecho en la Comunidad de Madrid se han descrito afloramientos durante momentos en que la temperatura del agua era inferior a 25°C (Sanchis y col., 2002).
- ↗ La forma química de nitrógeno inorgánico que está disponible podría influir en qué tipo de algas tuviera éxito. Se ha propuesto que las cianobacterias no fijadoras de nitrógeno son favorecidas por el amonio, las fijadoras, por la deficiencia de nitrógeno y las micro-algas por el nitrato. Aunque no existen pruebas concluyentes acerca de estas preferencias sobre las formas nitrogenadas (Oliver y Ganf 2000).
- ↗ Hay evidencias abrumadoras de que el ratio NT:PT *per se* no influye sobre la presencia de cianobacterias. Sin embargo, las fijadoras de nitrógeno pueden aparecer si el ratio NT:PT es bajo indicando que el nitrógeno es limitante (Oliver y Ganf 2000), pero incluso las cianobacterias no fijadoras aparecen cuando la relación es baja (Elser 1999).
- ↗ Se ha propuesto que las cianobacterias son más eficientes en condiciones en las que nos encontramos bajas concentraciones de carbono inorgánico (CO₂) (Caraco y Miller 1998). También se ha propuesto que las cianobacterias serían más eficientes en la competición por los elementos traza (Hyenstrand y col., 1998), pero hay pocos datos disponibles y no es consistente con la filogenia, por lo que son necesarios más datos para poder confirmar ésta como una de las



razones que expliquen la aparición de afloramientos cianobacterianos (Oliver y Ganf 2000).

⇒ Finalmente la última idea que desde los años 80 se ha defendido como una de las ideas fundamentales para explicar la aparición de afloramientos es la resistencia natural que presentan, sobre todo por parte de las colonias más grandes, a la predación por parte del zooplancton, lo que puede ser una ventaja sobre las demás micro-algas (Wiegand y Pflugmacher 2005). Sin embargo, (Elser 1999) ha propuesto un modelo conceptual, según el cual el último factor que controlaría la aparición de un afloramiento de cianobacterias tóxicas sería la presencia o no de *Daphnia*, aunque son necesarios una serie de factores nutricionales e hidrodinámicos previos que favorecerían la aparición del afloramiento. Esto junto con otras características como son la producción de compuestos alelopáticos que les permitirían desplazar al resto de los grupos algales (Hulot y Huisman 2004).

Recientemente se ha propuesto un método que intenta integrar esta complejidad utilizando para ello las interacciones ecológicas (por ejemplo la comunidad de fitoplancton interacciona con virus, hongos, bacterias, zooplancton y niveles tróficos superiores, (Sommer 1989)). Puesto que la sucesión de especies en el ecosistema depende de la interacción de múltiples factores ambientales y esto se observaría analizando esta sucesión de las especies en el fitoplacton. Por ejemplo (Roelke y Buyukates 2002) ha propuesto que en el embalse de Hartbeespoort, que se caracteriza por presentar afloramientos de *M. aeruginosa*, para que este ocurra, era necesario que se dieran dos condiciones: por un lado que existiera una sucesión de especies rápida y por otro lado que la diversidad que presentara el embalse antes del afloramiento fuera baja, de manera que en los embalses que presentan una diversidad elevada y la sucesión entre especies lenta, sería característico una resistencia a la presencia de afloramientos de cianobacterias tóxicas.



2. Objetivos

Se conoce poco de cual es la relevancia de las cianobacterias en los embalses españoles. Esta falta de información y la importancia estratégica que tienen los embalses para el consumo de la población, invita a analizar la presencia de este tipo de organismos en los embalses más relevantes que abastecen a la población. En este trabajo nos hemos centrado particularmente en los embalses de la Comunidad de Madrid.

Los objetivos de este capítulo son:

- ⇒ Analizar la presencia e importancia de las cianobacterias en la población fitoplanctónica durante el periodo en que la concentración de clorofila *a* en los lagos y embalses de la zona templada suele ser más elevada.
- ⇒ Estudiar dentro de la población de cianobacterias típicas en los embalses de la Comunidad de Madrid la importancia de las cianobacterias potencialmente tóxicas y su diversidad.
- ⇒ Relacionar la presencia de afloramientos de cianobacterias con las condiciones ambientales de cada embalse.
- ⇒ Establecer una definición de afloramiento para los embalses de la Comunidad de Madrid.



3. Materiales y Métodos.

3.1. Zona de Estudio.

La zona de estudio incluye los embalses de Lozoya, Río Sequillo, El Vellón, Santillana, Valmayor, San Juan y Picadas todos ellos situados en ríos pertenecientes a la cuenca hidrográfica del Tajo. Estos embalses pueden contener más del 42% de agua embalsable de la Comunidad de Madrid. Estos cuerpos de agua se muestrearon en el periodo de máxima probabilidad de formación de afloramientos entre el mes de Junio y Noviembre en el año 2001.y de Julio a Noviembre en el año 2002.

3.1.1. Embalse de Lozoya.

El embalse de Lozoya se encuentra situado en la provincia de Madrid, en el término municipal de Lozoya del Valle y Pinilla del Valle. Recibe aguas del río Lozoya y su cuenca está dominada fundamentalmente por gneiss, situándose el embalse en una zona donde también encontramos margas y conglomerados (Figura I.5) y (Figura I.12). Algunas de las características hidrométricas del embalse se pueden observar en la Tabla I.1.



Figura I.5: Foto del embalse de Lozoya. Marcados los puntos de muestreo L1 y L2



3.1.2. Embalse de Río Sequillo.

El embalse de Río Sequillo se encuentra situado en los términos municipales de Pinilla de Buitrago, El Cuadrón y Buitrago de Lozoya y embalsa aguas del río Lozoya, (Figura I.6) (Figura I.12). Este embalse que embalsa 49 Hm³ (Tabla I.1) presenta una profundidad media de casi 17,5 m. El embalse se encuentra construido en una zona donde geológicamente domina el gneiss.



Figura I.6: Foto del embalse de Río Sequillo. Marcado el punto de muestreo

3.1.3. Embalse de El Vellón.

Situado en los municipios de El Vellón y Pedrezuela (Figura I.7) (Figura I.12), este embalse está construido en una zona geológicamente más compleja que los embalses anteriores estando su cuenca dominada por gneiss y granitos como toda la Sierra Norte de Madrid, pero también encontramos areniscas y conglomerados y es particularmente importante una veta de calizas y margas. Algunas de las características de esta presa pueden verse en la Tabla I.1



Figura I.7: Foto del embalse de El Vellón. Marcado el punto de muestreo

3.1.4. Embalse de Santillana.

El embalse en Santillana embalsa aguas de río Manzanares, afluente del Tajo. Este embalse se encuentra situado en los términos municipales de Manzanares el Real y Soto del Real (Figura I.8) (Figura I.12). Cabe destacar que junto al embalse del Atazar, es el embalse que presenta una mayor superficie máxima, con un volumen máximo embalsado de 91 Hm³ (Tabla I.1). Geológicamente la cuenca del río está fundamentalmente dominada por rocas graníticas, presentando en el margen superior areniscas y alguna pequeña zona caliza.



Figura I.8: Foto del embalse de Santillana. Marcados los puntos de muestreo S1 y S2.



3.1.5. *Embalse de Valmayor.*

El embalse de Valmayor almacena aguas del río Aulencia, siendo el único situado en este río, afluente del río Guadarrama. Está construido en terrenos pertenecientes a los municipios de El Escorial, Valdemorillo y Colmenarejo (Figura I.9) (Figura I.12). Geológicamente está construido en una zona granítica con algunos gneiss. Este embalse se encuentra entre los mayores de la Comunidad de Madrid con un volumen de agua embalsado de 124 Hm³ y junto con el embalse de San Juan el único en el cual se permite la navegación a vela. Otros datos acerca de las características del embalse puede verse en la Tabla I.1.



Figura I.9: Foto del embalse de Valmayor. Marcados los puntos de muestreo V1, V2 y V2'.

3.1.6. *Embalse de San Juan.*

El embalse de San Juan, se encuentra situado en el río Alberche dentro del término municipal de San Martín de Valdeiglesias (Figura I.10) (Figura I.12). Se encuentra en una zona geológicamente dominada por gneiss. Es el mayor de los embalses analizados con una profundidad media de 21,2 m y embalsa más de 138 Hm³ (Tabla I.1).



Figura I.10: Foto del embalse de San Juan. Marcado el punto de muestreo.

3.1.7. Embalse de Picadas.

El embalse del Picadas se encuentra aguas abajo del de San Juan, embalsando igualmente aguas del río Alberche. Esta construido en terrenos de los municipios de Navas del Rey y San Martín de Valdeiglesias (Figura I.11) (Figura I.12), siendo el embalse más pequeño de todos los muestreados con un volumen embalsado de $15,2 \text{ Hm}^3$ y una profundidad media de $16,3$, lo que indica que se trata de un embalse situado en una valle profundo, pero ocupando muy poca superficie, $91,7 \text{ ha}$ Tabla I.1 Respecto a la geología nos encontramos en una zona granítica.

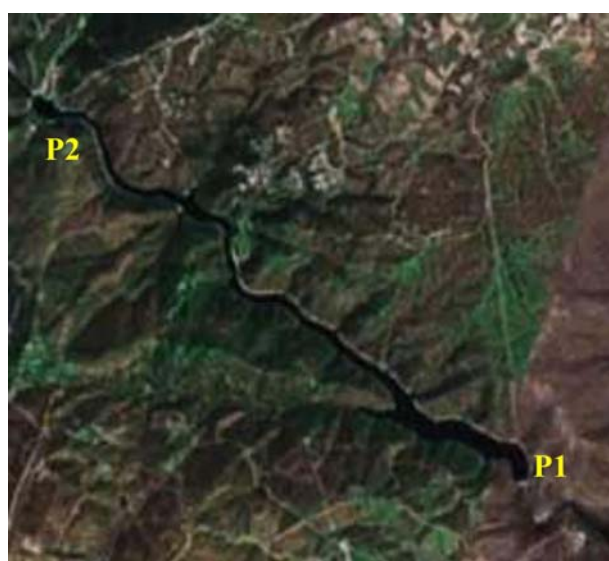


Figura I.11: Foto del embalse de Picadas. Marcado los puntos de muestreo P1 y P2.



Figura I.12. Situación de los embalses analizados, 1 = Lozoya , 2 = Río Sequillo, 3 = El Vellón, 4 = Santillana, 5 = Valmayor, 6 = San Juan, 7 = Picadas.

Embalse	V. max (Hm ³)	Area Max. (ha)	Prof. Max. (m)	Prof. Media (m)	Longitud/ Latitud
Lozoya	38	480	25	7.9	40° 56' 45'' N 3° 47' 07'' W
Río Sequillo	49	280	56	17.5	40° 58' 36'' N 3° 39' 31'' W
El Vellón	41	393	47	10.4	40° 45' 43'' N 3° 37' 29'' W
Santillana	91	1044	36	8.7	40° 42' 49'' N 4° 49' 5'' W
Valmayor	124	755	51	16.4	40° 32' 10'' N 4° 03' 19'' W
San Juan	138	650	67	21.2	40° 23' 37'' N 4° 19' 06'' W
Picadas	15,2	91,7	58	16.3	40° 20' 11'' N 4° 15' 12'' W

Tabla I.1: Características morfométricas de los embalses de Lozoya, Río Sequillo, El Vellón, Santillana, Valmayor, San Juan y Picadas. V = Volumen, Prof. = profundidad y Max. = máxima. La profundidad media fue obtenida de la división del Volumen máximo, por el área máxima.



3.2. Toma de muestras.

Las muestras fueron recogidas en botes de polietileno previamente lavados con ácido clorhídrico al 10% y posteriormente aclarados con agua desionizada (miliRho, Millipore). La toma de muestra se realizó a varios metros de la orilla y a una profundidad de 50 cm, evitando la recogida de material biológico acumulado si es que éste se encontraba presente. Las muestras recogidas se mantuvieron a 4 °C hasta realizar el procesamiento sin dejar pasar más de 4 horas tras la toma de éstas. Se tomaron tres botes diferentes, uno para el análisis taxonómico, otro para el análisis de clorofila *a* y microcistina y un último bote para el análisis de las características químicas del agua y análisis de fluorométrico de concentración de clorofila *a* y de grupos algales. Finalmente, también se tomó una muestra en un bote de 100 mL estéril para la medida de fósforo total.

Las muestras se tomaron en el mismo punto en todos los muestreos y en los embalses en los que se observó un afloramiento de microalgas se realizó el muestreo en un segundo punto suficientemente alejado del punto de muestreo usual, con el fin de obtener una mejor visión del embalse en global. En el caso del embalse de Valmayor se eligieron dos puntos extras diferentes en el año 2002 (V2') y en el año 2003 (V2)

3.3. Determinación de Nutrientes.

Se realizaron medidas de la concentración de nitrógeno inorgánico (amonio, nitrato y nitrito), fosfato y fósforo total. Para las 4 primeras variables se utilizó agua filtrada por GF/F (Whatman, Gran Bretaña) de 47 mm de diámetro, con un valor nominal de tamaño de partícula retenida de 0,7 µm, para el fósforo total se utilizó agua sin filtrar.

3.3.1. Análisis de amonio.

Para la medida de amonio (N-NH_4^+) se utilizó un laboratorio portátil modelo DREL/2010 (Hach, EEUU), equipado con espectrofotómetro de campo, realizando todas las



medidas en las siguientes 4 horas a la obtención de las muestras. Las medidas se efectuaron según una variación del método Nessler, modificado por Hach siguiendo los principios de (APHA 1998). El rango de detección estuvo entre 0,01 y 2,5 mg L⁻¹ de N-NH₄⁺.

3.3.2. *Análisis de nitrato y nitrito.*

La determinación de nitrato y nitrito se realizó simultáneamente mediante electroforesis capilar (CIA System, Waters, EEUU). Se trata de una técnica de separación en función de la diferente movilidad de los compuestos al ser inyectados en un capilar bajo el efecto de un campo eléctrico. La detección de los diferentes compuestos se realiza mediante la lectura de la absorbancia en la región del UV/vis.

La medida se hizo utilizando un capilar de sílice fundido de 75 µm de diámetro y 60 cm de longitud, rodeado de poliamida salvo en la zona que se utiliza como celda de medida para evitar la pérdida de sensibilidad que el recubrimiento produciría. La diferencia de potencial aplicado a ambos lados del capilar fue de 20 Kv, estando el polo positivo en el lado donde se encontraba la celda de detección. La toma de muestra se realizó por electromigración, el cual consiste en la aplicación de un potencial de 5 Kv, que concentra los aniones antes de proceder a su inyección. Esto permite aumentar el límite de detección, aunque en ese caso la conductividad de la muestra afecta a la determinación. Para evitar esta interferencia se calculó una relación entre la señal y la conductividad de una concentración conocida y con ello se corrigieron los datos obtenidos. La longitud de onda a la cual se realizó la detección fue de 214 nm empleando una lámpara de Zinc; a esta longitud de onda absorben tanto el nitrato como el nitrito, permitiendo la detección directa de ambos iones.

Para la realización de los análisis se utilizó un electrolito basado en el sulfato sódico. Para su preparación se mezclaron 142 mg de Na₂SO₄, 2,5 mL de OFM-OH (Waters, EEUU), 2 mL de una solución ácido bórico (40 gr L⁻¹) y se enrasó con agua Milli-Q hasta alcanzar un volumen final de 100 mL. El electrolito obtenido se filtró por una membrana GV de 0,22 µm (Millipore, EEUU). Con los elementos descritos, el rango de detección estuvo entre 0,02 y 2 mg L⁻¹ de N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻.



3.3.3. Análisis de fosfato.

La medición de fosfato se realizó sólo en las muestras del año 2003 y para ello se siguió como en el caso de del nitrato y el nitrito un método utilizando la electroforesis capilar. No obstante, el fosfato no absorbe en la región del UV/vis, por esta razón hay que utilizar un método indirecto de medida. En este caso, el electrolito utilizado estuvo basado en el cromato, que absorbe a 254 nm (lámpara de mercurio). En este caso cuando llega a la celda de detección el ión, se produce una disminución en la absorbancia de electrolito proporcional a la concentración de analito. Tanto el capilar, como las condiciones eléctricas fueron las mismas que las utilizadas en el análisis de nitrato y nitrito.

El electrolito utilizado fue cromato sodico 7 mM / OFM-OH 0,5 mM ajustado a pH = 8 con ácido bórico. Antes de su análisis se añadió a las muestras clorato que sirvió como patrón interno y evito las diferencias de carga que producen las diferencias de conductividad de las muestras. El rango de detección estuvo entre 0,01 y 0,5 mg L⁻¹ de P-HPO₄²⁻.

3.3.4. Análisis de fósforo total.

Para analizar el fósforo total de las muestras de agua bruta son necesarias dos reacciones consecutivas. En una primera reacción se realizó una digestión ácida con persulfato potásico que tiene como objetivo el liberar todo el fósforo presente en la materia orgánica. Para ello a cada 50 mL de muestra se le añadió 10 mL de reactivo de digestión. Este reactivo de digestión contenía 6 % (peso/volumen) K₂S₂O₈ y H₂SO₄ a una concentración 0,36 N. Posteriormente se autoclavó la mezcla durante 30 minutos a 121°C. Posteriormente y tras esperar a que la muestra se atemperara se equilibrio el pH de la muestra a pH = 7 con NaOH.

El análisis de la cantidad de fósforo presente en la muestra ya digerida fue realizado siguiendo el método del ácido ascórbico (método 4500-P) siguiendo al instrucciones descritas en el (APHA 1998). El rango de detección fue entre 0,01 y 0,5 mg P L⁻¹.



3.4. Determinación de variables físico-químicas.

Las variables físico-químicas, temperatura, conductividad, oxígeno disuelto, turbidez y pH, fueron medidos “in situ” por medio de una sonda multiparamétrica YSI modelo 6920 (EEUU) calibrada con anterioridad. Para ello, la sonda se sumergió permitiendo que el oxígeno disuelto se estabilizara durante varios minutos antes de comenzar la toma de muestras.

3.5. Determinación del contenido de Clorofila *a*.

Las muestras para el análisis de clorofila *a* fueron conservadas a 4 °C hasta su llegada al laboratorio donde fueron filtradas a través de filtros GF/F (Whatman, Gran Bretaña) de 47 mm de diámetro, con un valor nominal de tamaño de partícula retenida de 0,7 µm. Para la filtración se utilizó una rampa de filtración de aluminio (Pall corp., EEUU) y una bomba de vacío Me 4P (Vacuubrand GMBH, Alemania), a presión negativa moderada, con el fin de evitar la rotura celular. El volumen de filtración fue de 500 mL.

Las extracciones se realizaron a partir del material retenido en los filtros cortándolos en pequeños pedazos, que fueron introducidos en un tubo de centrifuga. Al material retenido en cada filtro se le realizaron 2 extracciones consecutivas de 24 horas con metanol al 90%. La medida de absorbancia fue realizada a dos longitudes de onda, 750 y 665 nm, en un espectrómetro de doble haz Hitachi U-2000 (Hitachi, Japón). La absorbancia fue convertida en concentración aplicando el coeficiente de extinción de Marker (Marker y col., 1980).

3.6. Determinación de clorofila *a* y grupos algales por métodos fluorométricos.

La determinación fluorométrica de la clorofila *a* total y su asignación a los diferentes grupos algales (algas verdes, diatomeas, criptofitas y cianobacterias) fue realizada mediante un fluorómetro portátil marca BBE Moldake (Alemania).



La realización de la asignación de los distintos grupos algales se basa en el diferente espectro de excitación/emisión que los organismos presentan. Los diferentes grupos algales se caracterizan por presentar diferentes y característicos pigmentos en sus sistemas fotosintéticos (Tabla I.2). El método fluorométrico se basa en las diferentes características ópticas de los pigmentos y la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* que provocan al ser excitados a diferentes longitudes de onda, permitiéndonos así establecer una asignación de qué proporción de la clorofila *a* total pertenece a cada uno de estos grupos. El fluorómetro utilizado posee 5 LEDs que emiten en 5 longitudes de onda diferentes, 450, 525, 570, 590 y 610 nm y posteriormente el sistema recoge la fluorescencia producida a la longitud de onda de 680 nm en que emite la clorofila *a*.

Longitud de onda (nm)	Pigmento	Grupo algal
450	Clorofila <i>a</i> y <i>b</i>	<i>Chlorophyceae</i>
525	Fucoxantina	<i>Bacillariophyceae</i>
	Peridina	<i>Dinophyceae</i>
570	Ficoeritrina	<i>Cryptophyceae</i>
		<i>Cyanophyceae</i>
590 y 610	Ficocianina	<i>Cyanophyceae</i>

Tabla I.2. Identificación de las longitudes de onda emitidas por cada uno de los LEDs y pigmento al que excitan y grupo algal al que pertenecen.

Las muestras se analizaron en las 5 horas siguientes a su recogida, se mantuvieron en oscuridad y a su llegada a laboratorio fueron dejadas atemperar durante 30 minutos pasados los cuales y después de realizar un blanco con agua de la muestra filtrada por filtros GF/F, para evitar las interferencias que las sustancias amarillas pudieran producir, se analizaron las muestras recogidas sin realizar ningún tipo tratamiento previo. Una pérdida de calibración del aparato impidió obtener los datos de grupos algales el año 2002 desde mediados de octubre hasta el final del periodo de muestreo.



3.7. Identificación de géneros cianobacterianos.

Para la identificación de las especies de cianobacterias planctónicas, una muestra de agua de un litro fue mantenida sin mover durante la noche para permitir que las cianobacterias con capacidad de flotación subieran a la superficie. Posteriormente fueron recogidas con una pipeta y se identificaron microscópicamente en un microscopio óptico Olympus BH-2 (Japón) según ((Geitler 1932); (Komarek y Anagnostidis 1989) y (Komarek y Anagnostidis 1999)). La abundancia relativa de las especies de las cianobacterias presentes se realizó en categorías siguiendo la siguiente escala de abundancias: 0 = Ausencia, 1 < 1%, 2 = 1-10%, 3 = 11-25%, 4 = 26-50%, 5 = 51-75%, 6 = 75-100% (Necchi y col., 1991).

3.8. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó por medio de los paquetes estadísticos SigmaStat 3.01 y SPSS 14.0. El análisis de correspondencias se realizó por el paquete informático CANOCO 4.0.



4. Resultados.

Poco se conoce acerca de la importancia que las cianobacterias tienen en los embalses de la Comunidad de Madrid y en extensión en los cuerpos de agua dulce mediterráneos. Pero dado que la eutrofización parece incrementar la importancia de las cianobacterias sobre otros organismos fotosintéticos, podría esperarse que estos organismos fueran relevantes dentro de la población fitoplactónica presente en los embalses de la Comunidad de Madrid. Para estudiar su importancia se seleccionaron 7 embalses y se analizaron la presencia de cianobacterias planctónicas, los nutrientes y las características físico-químicas del agua. Los valores encontrados en los puntos secundarios en los embalses analizados fueron muy similares a los encontrados en el punto principal, aquel que fue muestreado en todas las ocasiones. Los datos recogidos en los puntos secundarios pueden verse en el ANEXO, salvo para el embalse de Picadas que muestra claras diferencias entre un punto y otro, razón por la cual se tratarán en este capítulo.

4.1. Embalse de Lozoya.

El embalse se muestreó en el punto principal en 11 ocasiones en el año 2002 y en 12 ocasiones en 2003. El punto secundario, se muestreó en un ocasión en el año 2002 y en dos en el año 2003. En general, este embalse presentó concentraciones superiores de biomasa en 2002 en comparación a las obtenidas durante 2003 y respecto a las variables químicas las concentraciones encontradas fueron del mismo rango en ambos años, siendo los máximos encontrados ligeramente inferiores también en 2003 a los hallados en 2002.

4.1.1. Nutrientes.

Como nutrientes se midieron las concentraciones de nitrato, nitrito y amonio (nitrógeno inorgánico disuelto o NID) y de fósforo total desde el mes de agosto del 2002 en adelante y del fosfato soluble en 2003 (Figura I.13). En general las concentraciones de nutrientes se mantuvieron bajas hasta finales de octubre momento en el cual, coincidiendo con la rotura de la termoclina, se produjo una entrada de nutrientes a la parte fótica del sistema. Este incremento en los nutrientes fue especialmente importante en el caso del nitrato en ambos años



y del fosfato soluble en 2003, único año para el cual existen valores para esta variable en todos los embalses. Respecto a la relación entre nitrógeno inorgánico y el fósforo total, hallamos tendencias contrarias en ambos años. Así, mientras que en el 2002 se alcanzan los máximos valores (superiores a 20) a finales de año, coincidiendo con la rotura de la termoclina, en el 2003 los valores únicamente fueron superiores a 5 en el primer muestreo del año, en el mes de junio, manteniéndose estables a partir de ese momento. El fósforo total por otro lado presentó patrones de concentración diferentes al resto de nutrientes, alcanzándose los valores más elevados en los meses de agosto, septiembre y octubre antes de la rotura de la termoclina.

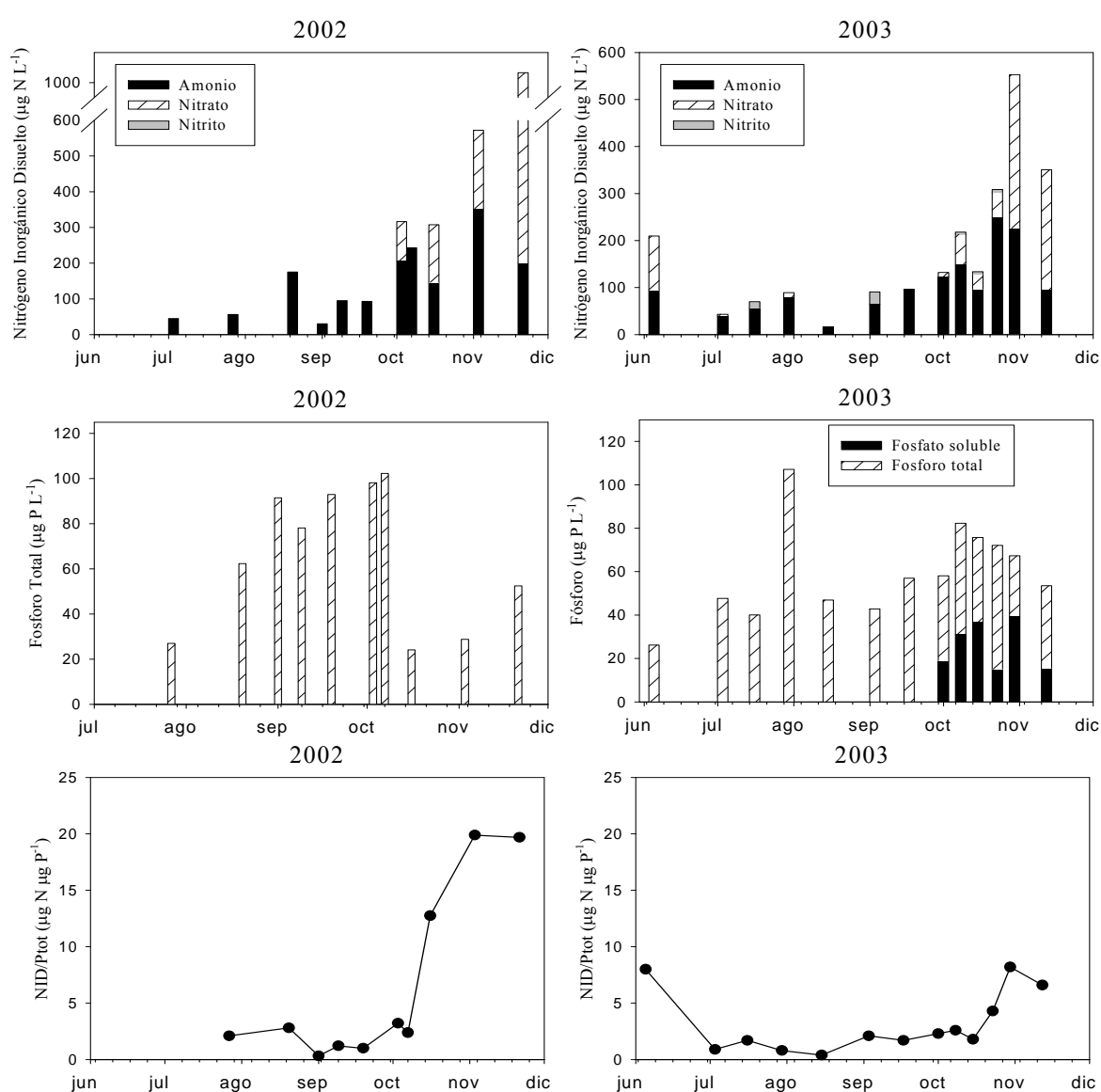


Figura I.13. Concentraciones de nutrientes en el embalse de Lozoya. Se muestran las concentraciones de nitrato, nitrito, amonio, fósforo total y relación NID/Ptot para el año 2002 y 2003 y de fosfato soluble para el año 2003



4.1.2. Variables físico-químicas.

Dentro de las variables físico-químicas la temperatura fue la que presentó valores más similares en los años (Figura I.14), El resto de ellos presentaron mayores diferencias. Así, en el caso de la turbidez, oxígeno disuelto y pH el año 2002 presentan un pico en el mes de septiembre en el cual las tres características son superiores a las que se presentaron en ese mismo momento en el año siguiente, aunque la turbidez aparece ligeramente desplazada en el tiempo con respecto a las otras dos variables. En el año 2003 si embargo en ese mismo momento puede observarse una tendencia contraria, mostrando tanto el oxígeno disuelto y del pH una disminución respecto a resto del año. Respecto a la conductividad los valores observados son propios de aguas con baja carga de sales disueltas como ocurre en zonas de rocas silíceas en las que se encuentra situada la cuenca de este embalse. De este modo, en el 2002 los valores fueron estables durante todo el año mientras que en el 2003 encontramos valores bastante inferiores al principio del periodo de muestreos elevándose posteriormente hasta valores similares a los que se presentaron en 2002.

4.1.3. Clorofila *a* y fitoplancton.

El embalse de Lozoya ha presentado concentraciones de clorofila *a* muy variables en ambos años. En el año 2002 la concentración de clorofila *a* tanto media como máxima fue muy superior a la que se determinó en el año 2003. Así, en el año 2002 la concentración máxima se alcanzó en el mes de septiembre y fue superior a $100 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$ (Figura I.15). Por otro lado, en el año 2003 las concentraciones máximas de clorofila *a* fueron inferiores a $20 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$, si bien el máximo de este año se encontró también en el mes de septiembre. Cuando analizamos la preponderancia de los diferentes grupos algales, observamos que las cianobacterias fueron el grupo más importante durante el periodo de muestreo en los dos años estudiados, con un porcentaje medio de presencia superior al 50% en ambos años ($79,6\% \pm 23,4\%$ en el año 2002 y $59,4\% \pm 21,4\%$ en el 2003). Esta importancia relativa se puede observar claramente en los momentos en los que se alcanzaron las concentraciones máximas de clorofila *a*, puesto que los máximos de los dos años coinciden con el momento en el que las cianobacterias fueron el grupo dominante en la población de fitoplanctónica, siendo



especialmente claro en el año 2002 en el cual, coincidiendo con el máximo de biomasa algal, las cianobacterias dominaron de manera exclusiva la población.

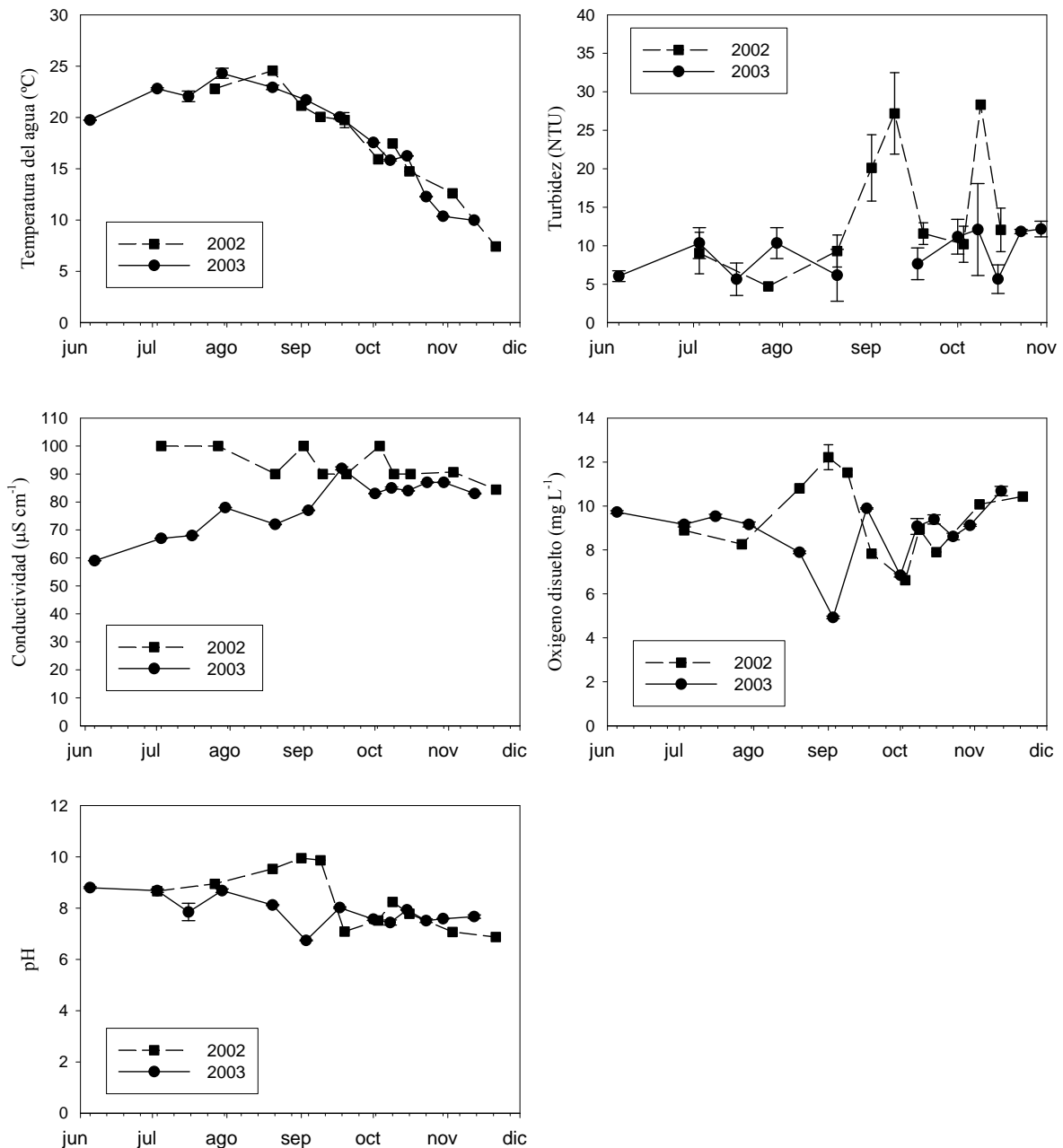


Figura I.14. Variables físico-químicas analizadas en el embalse de Lozoya. Se muestran la temperatura del agua, turbidez, conductividad, oxígeno disuelto y pH para el año 2002 y 2003

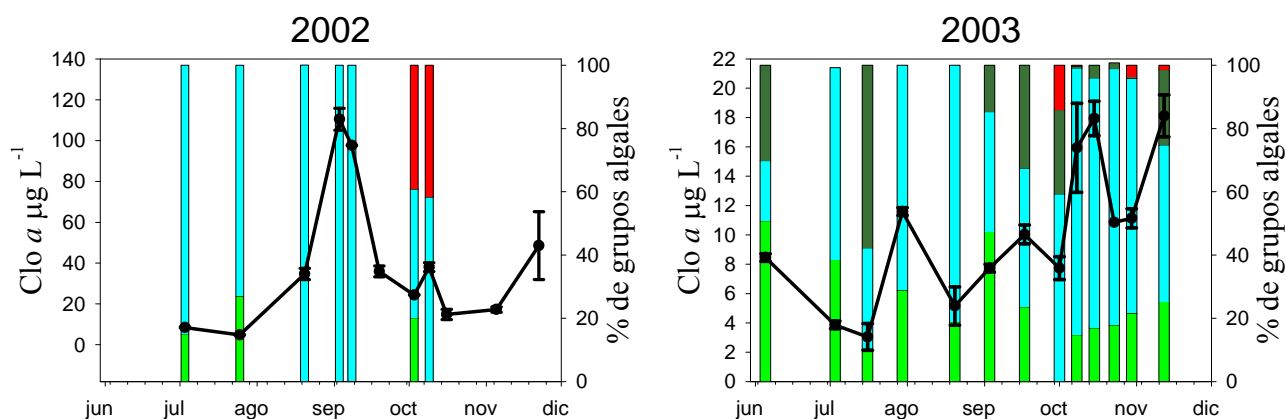


Figura I.15. Concentraciones de clorofila *a* y porcentaje de grupos algales en el embalse de Lozoya. Se muestran las concentraciones de clorofila *a* determinadas mediante extracción metanólica (línea continua) y % de esa clorofila *a* (barras) que pertenece a cada uno de los cuatro grupos algales (algas verdes (verde), cianobacterias (azul), diatomeas (marrón) y criptofitas (rojo) determinada por métodos fluorométricos. Nótese la diferencia en la escala del eje Y.

En paralelo al resto de análisis se realizó el análisis microscópico de las especies de cianobacterias planctónicas presentes (Figura I.16). Los dos años se caracterizaron por presentar una elevada diversidad de cianobacterias (fue el embalse que presentó un mayor número de especies de cianobacterias diferentes). Además, es un embalse que se caracteriza por presentar una abundancia elevada de cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno, siendo posible identificar hasta 5 especies de cianobacterias filamentosas fijadoras: 4 de ellas pertenecientes al género *Anabaena* y otra perteneciente al género *Aphanizomenon*. Las otras cuatro especies de cianobacterias presentes pertenecieron al orden de las Chroococales: tres pertenecientes al género *Microcystis* y la otra perteneciente al género *Woronichinia*.

Durante todo el periodo de muestreo en el año 2002, el género más abundante fue el género *Anabaena*, siendo especialmente importante la especie *A. crassa* que fue dominante en el momento en que la concentración de clorofila *a* alcanzó el máximo. Posteriormente y en paralelo a la disminución de clorofila *a*, se produjo un cambio en el género más importante en la población cianobacteriana, que pasó a ser *W. naegeliania* y además se apreció una ligera subida de *M. aeruginosa*. Finalmente, en los últimos muestreos, el género *Anabaena* volvió a



ser el dominante, perteneciendo a este género las especies codominantes que podíamos encontrar.

En el año 2003 se incrementa en general la importancia de las cianobacterias pertenecientes al orden Chroococales, de tal manera que dos géneros de dicho orden, *Microcystis* y *Woronichinia*, dominaron la población a lo largo del año. En un primer momento fue *Microcystis* el género que dominó hasta principios de septiembre y posteriormente fue sustituida por *Woronichinia*. Respecto a la presencia de *Anabaena*, estuvo presente durante todo el periodo de muestreo, pero sólo llegó a ser mayoritaria en una fecha puntual en todo el periodo de muestreo, aunque en momentos concretos llegó a codominar junto a las Chroococales. Respecto a la diversidad en número de especies fue muy similar al encontrado en 2002, detectándose seis especies diferentes, siendo en este caso los géneros *Microcystis* y *Anabaena* la que más especies diferentes mostraron con tres cada una. Las tres especies más importantes durante este año fueron, *M. aeruginosa*, *A. flos-aquae* y *W. naegeliana* que fueron sucediéndose a lo largo del año.

4.2. Embalse de Río Sequillo.

Este embalse se encuentra aguas abajo del embalse de Lozoya y se muestreó en un solo punto. Se analizó en nueve ocasiones en 2002 y siete ocasiones en 2003. Este embalse presentó valores de biomasa y de características químicas similares en los dos años de muestreo.

4.2.1. Nutrientes.

Como índice de nutrientes se midieron las concentraciones de nitrato, nitrito y amonio (nitrógeno inorgánico disuelto o NID) y de fósforo total desde el mes de agosto del 2002 en adelante y el fosfato soluble en 2003 (Figura I.17). Los valores observados en el 2003 parecen indicar que no llegamos a observar la rotura de la termoclina, puesto que los valores máximos de nitrógeno inorgánico disuelto y fósforo se observaron a principio de la temporada de muestreo manteniéndose bastante estables con posterioridad y sin que pueda verse el incremento típico que ocurre después la rotura de la estratificación, fenómeno que sí observamos en el año 2002.

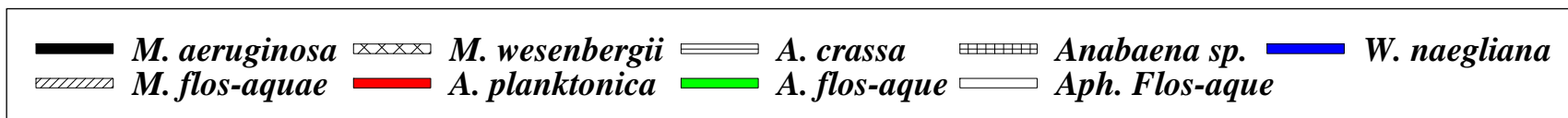
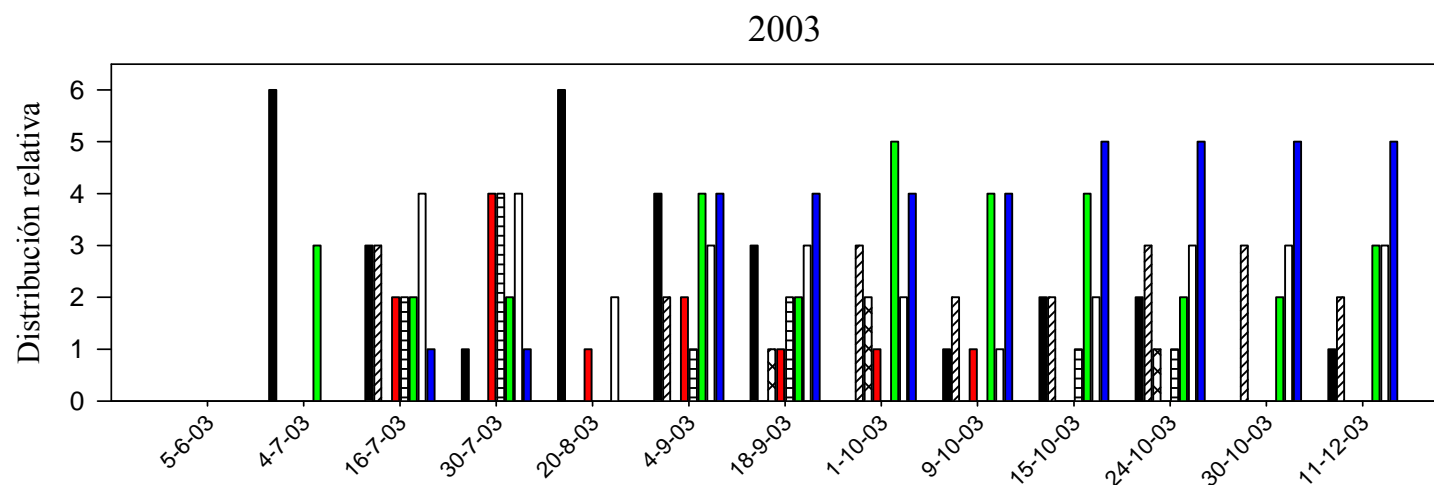
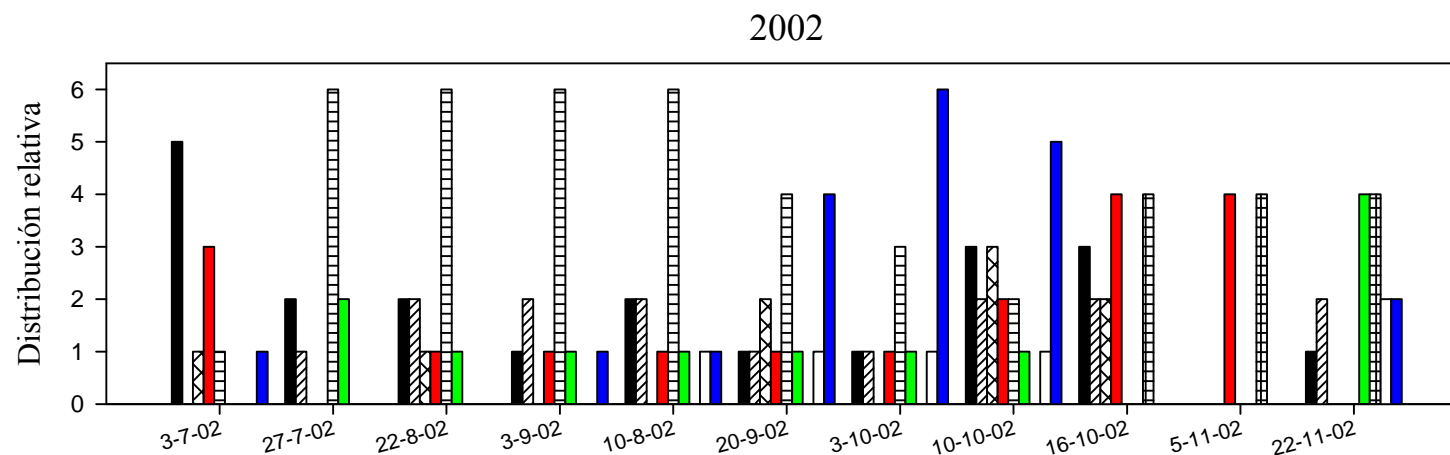


Figura I.16. Distribución relativa de cianobacterias planctónicas presentes en el embalse de Lozoya.



Esta idea se encuentra apoyada porque la temperatura del agua en el año 2003 no alcanzó el valor mínimo observado en el año 2002. Las concentraciones de nutrientes en general parecen ser superiores de todas maneras en el año 2002 comparadas a las obtenidas en el año 2003. Por ejemplo, durante los meses de septiembre y octubre las concentraciones de nitrógeno inorgánico fueron aproximadamente el doble en el 2002 que en el 2003, cosa que también ocurre con el fósforo total. Cuando analizamos la relación NID/Ptot se observa un comportamiento inverso en ambos años. Así en el año 2003 los valores alcanzaron un máximo superior a 15 a principios de septiembre, mientras que en 2002 el máximo fue ligeramente superior a 6 y se observó a principios de la temporada de muestreo, en el mes de junio.

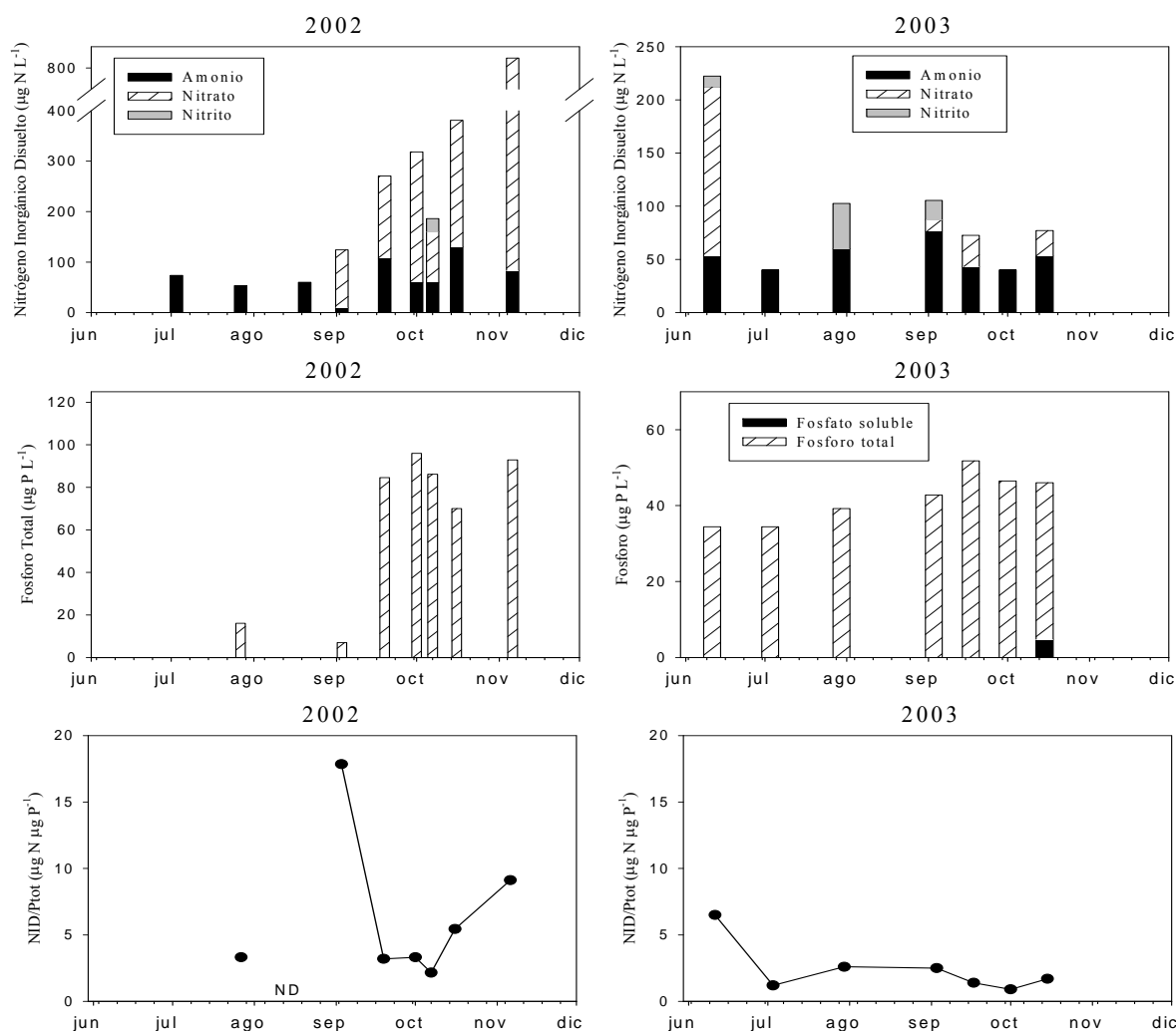


Figura I.17. Concentraciones de nutrientes en el embalse de Río Sequillo. Se muestran las concentraciones de nitrato, nitrito, amonio, fósforo total y relación NID/Ptot para el año 2002 y 2003 y de fósforo soluble para el año 2003.



4.2.2. Variables físico-químicas.

Las variables físico-químicas fueron muy similares en los dos años (Figura I.18). Sólo en el caso de la conductividad existen pequeñas diferencias entre los dos años, encontrándonos valores de aproximadamente $90 \mu\text{S cm}^{-1}$ en el año 2002 y de $70 \mu\text{S cm}^{-1}$ en el año 2003. Cabe destacar que en este embalse el pH estuvo cercano a la neutralidad durante los dos años analizados

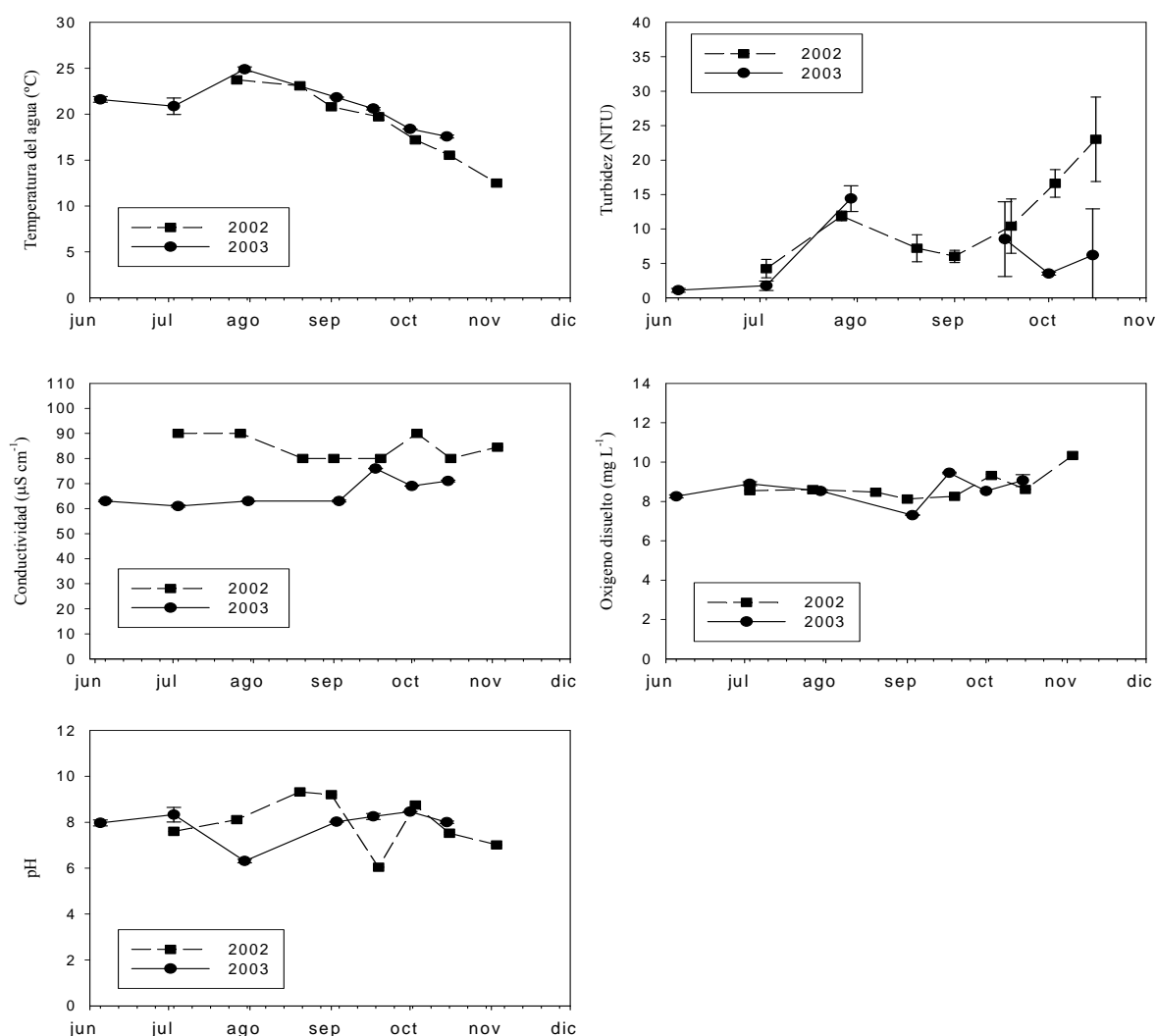


Figura I.18. Variables físico-químicas encontradas en el embalse de Río Sequillo. Se muestran la temperatura del agua, turbidez, conductividad, oxígeno disuelto y pH para el año 2002 y 2003.



4.2.3. Clorofila *a* y fitoplancton.

El embalse de Río Sequillo ha presentado concentraciones de clorofila *a* relativamente bajas, los máximos detectados de la misma durante los dos años de muestreo fueron inferiores a 40 $\mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$ (Figura I.19), alcanzándose este máximo en los dos periodos en el mes de octubre. Como en el caso del embalse anterior, las concentraciones de clorofila *a* fueron claramente inferiores en el año 2003 cuando las comparamos con el 2002, así los valores medios de la concentración en 2003 fueron tres veces inferior a los que se mostraron en el año 2002. Cuando analizamos la importancia de los diferentes grupos algales observamos claras diferencias entre los dos años. Mientras que en 2002 las cianobacterias dominaron la comunidad fitoplanctónica, en el 2003 las cianobacterias fueron menos importantes, siendo las diatomeas el grupo algal más importante cuando la clorofila *a* alcanzó el máximo

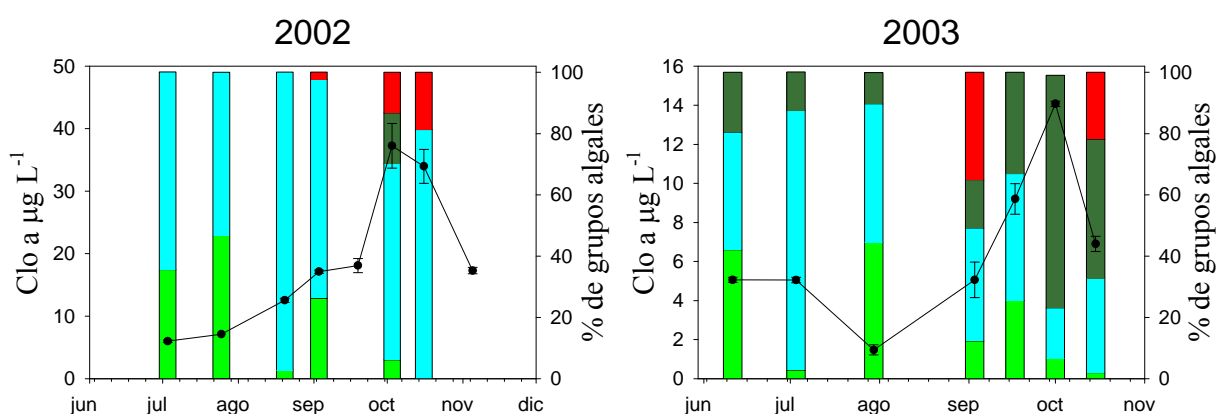


Figura I.19. Concentraciones de clorofila *a* y porcentaje de grupos algales en el embalse de Río Sequillo. Se muestran las concentraciones de clorofila *a* determinadas mediante extracción metanólica (línea continua) y % de esa clorofila *a* (barras) que pertenece a cada uno de los cuatro grupos algales (algas verdes (verde), cianobacterias (azul), diatomeas (marrón) y criptofitas (rojo) determinada por métodos fluorométricos. Nótese la diferencia en la escala del eje Y.

Cuando analizamos las cianobacterias planctónicas presentes durante este periodo (Figura I.20), podemos observar que las especies encontradas fueron similares a las encontradas en el embalse de Lozoya, situado aguas arriba de este embalse encontrándose en él



las mismas especies, salvo que el embalse de Río Sequillo no presentó *Woronichinia* en 2002 y que en el 2003 no se detectó ni *W. naegeliana*, ni *M. wesenbergii*

Durante el año 2002 el género dominante como en el caso del embalse de Lozoya fue el género *Anabaena*, pero en este caso la especie más importante y que dominó durante todo el periodo de muestreo fue *A. planctonica* y no *A. crassa*, siendo mayoritaria durante la mayor parte del periodo. La otra especie en importancia en este embalse fue la *W. naegeliana* mientras que el género *Microcystis* sólo tuvo importancia en momentos puntuales, en el primer muestro y a principios del mes de septiembre.

En el año 2003 se incrementa en general la importancia de las cianobacterias pertenecientes al orden Chroococales y el género *Microcystis* en particular. Alguna especie de este orden fue como mínimo codominante en todos los muestreos en los cuales se detectaron cianobacterias en el estudio microscópico. Mientras las especies pertenecientes al género *Anabaena*, el mayoritario el año anterior no llegó a ser dominante en ninguno de los muestreos realizados. La especie más importante dentro del género *Anabaena* a lo largo de este año fue diferente a lo largo del periodo analizado, en los dos primeros muestreos la especie más importante fue *A. flos-aquae*, posteriormente fue sustituida *A. planctonica* la especie dominante el año anterior. Respecto a la diversidad el mayor número de cianobacterias fue detectado cuando fue mayor la concentración de clorofila *a*, detectándose en ese momento 6 especies diferentes.

4.3. Embalse de El Vellón.

Este embalse se ubica en una región peculiar dentro de las embalses de la Comunidad de Madrid puesto que esta situado en una zona donde las rocas calizas tienen cierta importancia mientras que el resto de los embalses en general se encuentran situados en zonas dominadas por rocas silíceas. Este embalse se muestreó en una sólo punto, en 9 ocasiones en los dos años analizados.

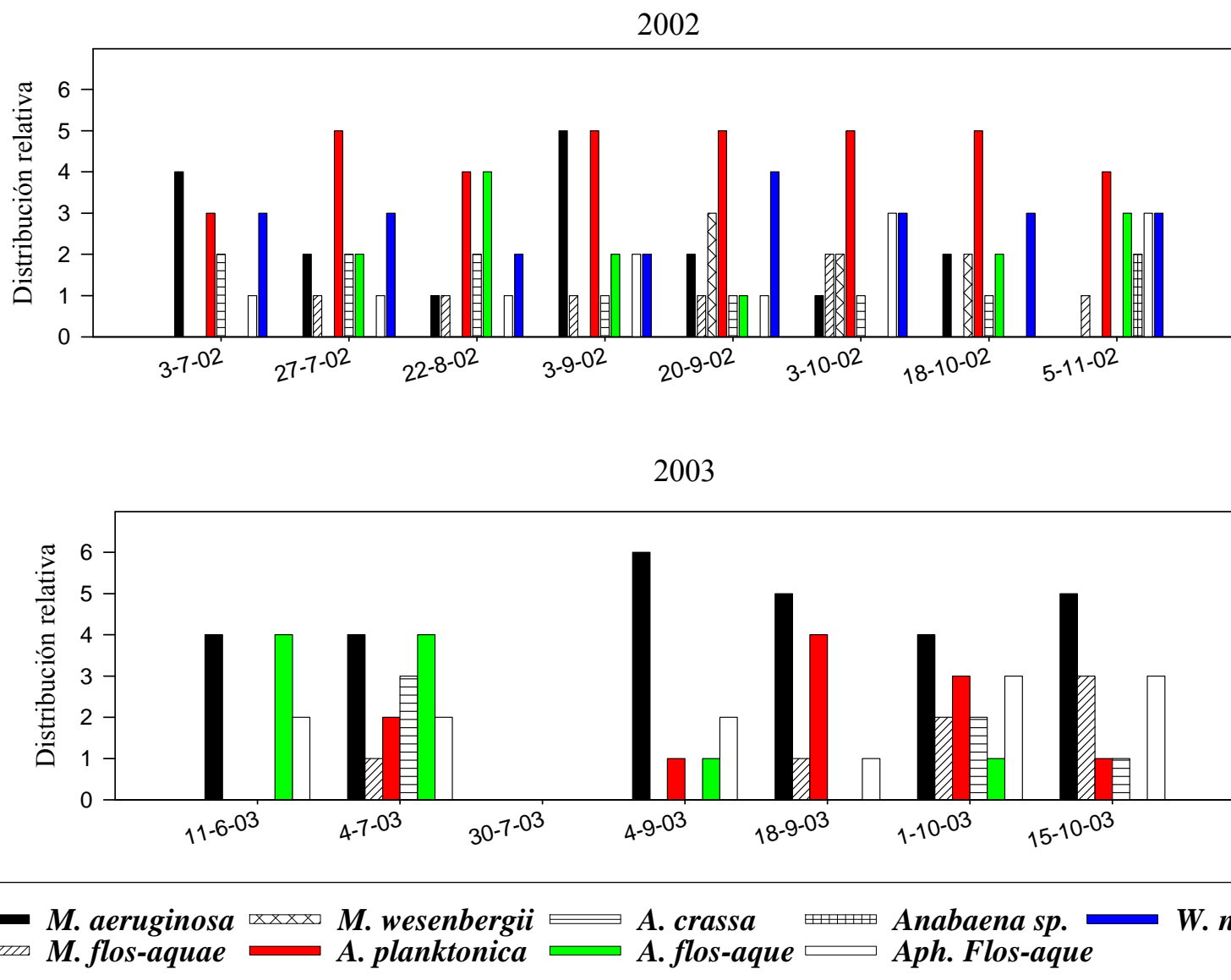


Figura I.20. Distribución relativa de cianobacterias planctónicas presentes en embalse de Río Sequillo.



4.3.1. Nutrientes.

El análisis de los nutrientes presentes en este embalse a lo largo del periodo de muestreo indica que las tendencias generales a lo largo del periodo fueron muy similares en los dos años estudiados (Figura I.21).

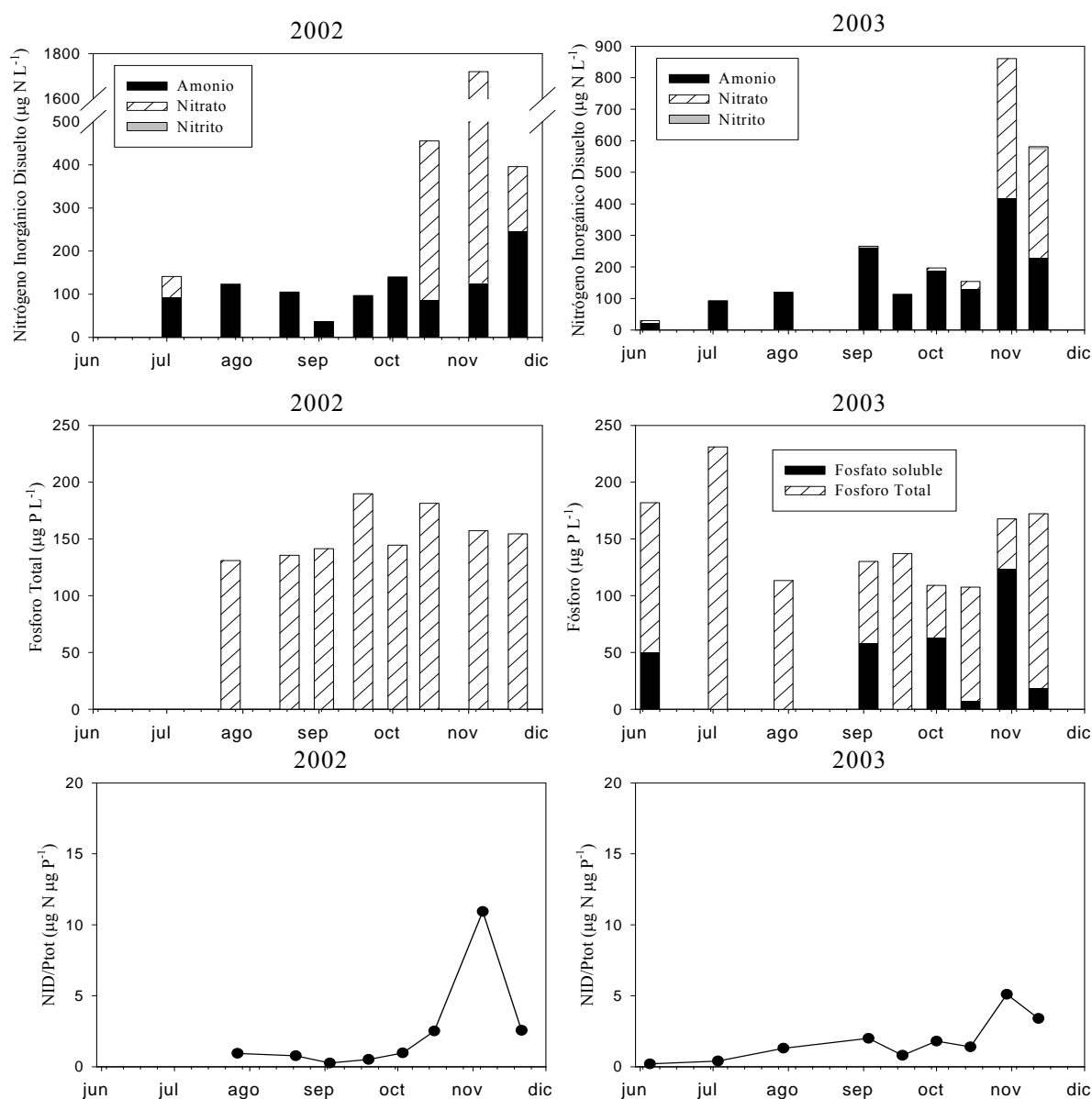


Figura I.21. Concentraciones de nutrientes en el embalse de El Vellón. Se muestran las concentraciones de nitrato, nitrito, amonio, fósforo total y relación NID/Ptot para el año 2002 y 2003 y de fosfato soluble para el año 2003.



Los valores de nitrógeno se encontraron alrededor de $100 \mu\text{g N L}^{-1}$, hasta la subida general al final del periodo de muestreo que llegó a valores por encima de $500 \mu\text{g N L}^{-1}$. Mientras que el fósforo total estuvo alrededor de $150 \mu\text{g P L}^{-1}$ a lo largo de todo el año. La relación NID/Ptot presentó valores en general inferiores a 4, sólo superando este valor cuando se alcanzaron los máximos anuales. De todas las variables analizadas, únicamente el nitrógeno inorgánico disuelto mostró ligeras diferencias entre dos años estudiados. Los valores máximos alcanzados en el 2002 fueron casi el doble de los encontrados en el 2003. Este hecho unido a que el fósforo total se mantuvo muy estable, hace que la relación nitrógeno – fósforo total, fuera casi dos veces mayor en 2002 que en 2003.

4.3.2. Variables físico-químicas.

Cuando se analizan los datos físico-químicos encontrados en el embalse de El Vellón (Figura I.22), destaca la diferencia observada en los valores de conductividad entre el año 2002 y el 2003, mientras que en el 2002 presenta valores superiores a $200 \mu\text{S cm}^{-1}$, en el 2003 valores fueron claramente inferiores siendo estos de alrededor de $125 \mu\text{S cm}^{-1}$. Esta es la única variable que presenta diferencias. El pH muestra valores elevados ambos años alcanzando solamente valores próximos a la neutralidad al final del periodo de muestreo. El oxígeno disuelto estuvo en concentraciones alrededor de 8 mg L^{-1} , alcanzando máximos de 10 mg L^{-1} al principio de la temporada de muestro. Los valores de turbidez presentan una gran variabilidad, entre muestreos lo que dificulta encontrar diferencias entre los dos años y finalmente la temperatura estuvo por encima de $20 ^\circ\text{C}$ hasta el mes de mediados del mes de septiembre para caer posteriormente hasta los $10 ^\circ\text{C}$.

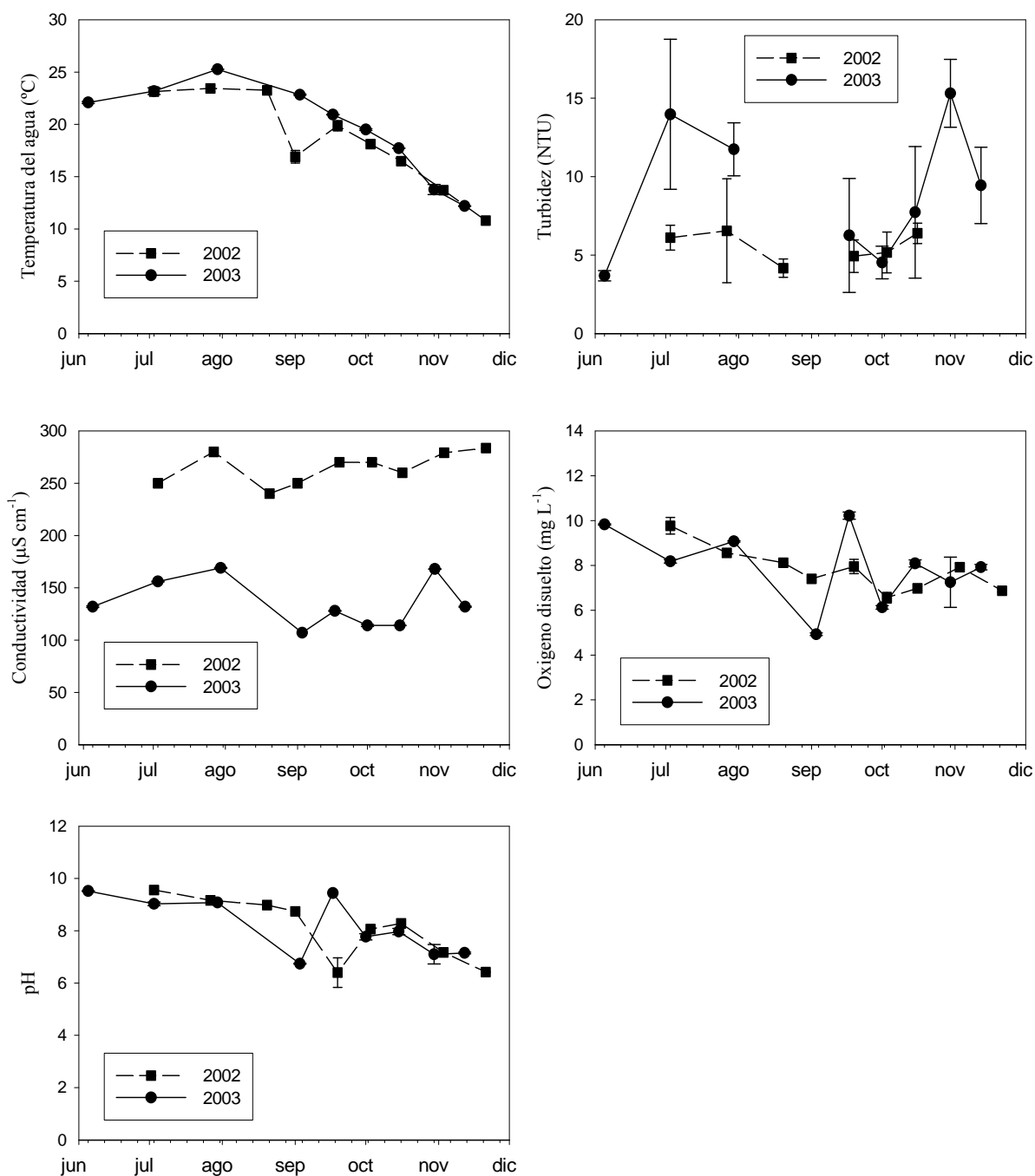


Figura I.22. Variables físico-químicas encontradas en el embalse de El Vellón. Se muestran la temperatura del agua, turbidez, conductividad, oxígeno disuelto y pH para el año 2002 y 2003.



4.3.3. Clorofila *a* y fitoplancton.

El embalse de El Vellón al presentó bajas concentraciones de clorofila *a* cuando lo comparamos con otros embalse analizados y fueron muy similares en los dos años, con medias prácticamente idénticas ($17,8 \pm 7,7 \mu\text{g Clo L}^{-1}$ en 2002 y $17,2 \pm 9,3 \mu\text{g Clo L}^{-1}$ en 2003) y (Figura I.23). Sin embargo las concentraciones máximas de clorofila *a* se alcanzaron en momentos diferentes, en el mes de noviembre en el año 2002 y en septiembre en el 2003. Respecto a la importancia de los diferentes grupos algales en este embalse observamos que en los dos años las algas verdes fueron especialmente importantes, siendo las cianobacterias mayoritarias solo en el mes de agosto, mes que se caracteriza usualmente por presentar bajas concentraciones de clorofila *a*.

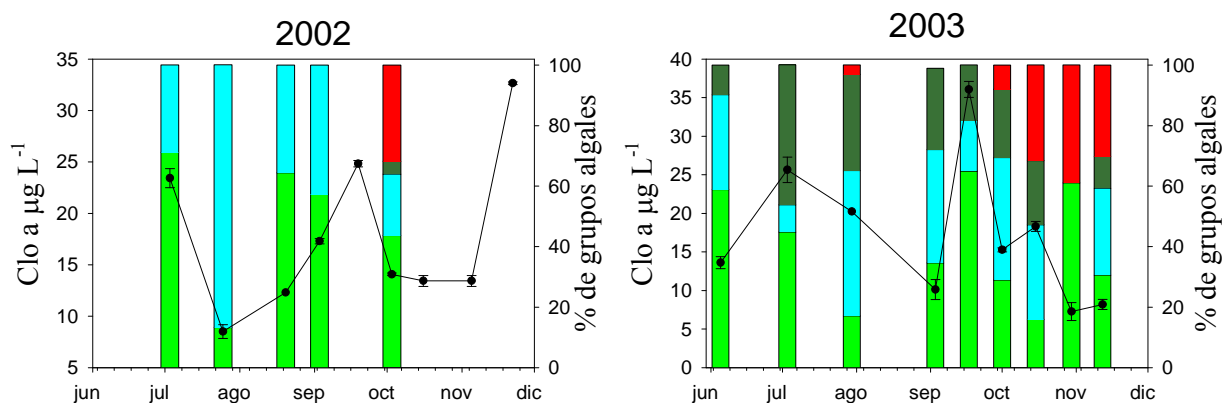


Figura I.23. Concentraciones de clorofila *a* y porcentaje de grupos algales en el embalse de El Vellón. Se muestran las concentraciones de clorofila *a* determinadas mediante extracción metanólica (línea continua) y % de esa clorofila *a* (barras) que pertenece a cada uno de los cuatro grupos algales (algas verdes (verde), cianobacterias (azul), diatomeas (marrón) y criptofitas (rojo) determinada por métodos fluorométricos.

Respecto a las cianobacterias planctónicas que pudieron ser detectadas durante este periodo (Figura I.24), nos encontramos ante el primer embalse que en ambos años estuvo dominado por cianobacterias pertenecientes al orden Chroococales, y que mostró como especie mas importante dentro del orden Nostocales no a una especie perteneciente al género *Anabaena* sino a una del género *Aphanizomenon*, *Aph. flos-aquae*.



Durante el año 2002 las dos especies mayoritarias pertenecieron al género *Microcystis*, *M. aeruginosa* dominó durante la primera parte del año, y posteriormente le sustituyó *M. wessenbergii*, ninguna otra especie llegó a presentar una importancia durante todo el periodo de muestreo. La sucesión entre las dos especies ocurrió de manera progresiva *M. wessenbergii* fue mayoritaria ya hasta el final del periodo de muestreo.

En el año 2003 se produce importante respecto al año anterior, una de las dos especies mayoritarias *M. wessenbergii*, prácticamente desapareció. En este año en las primeras fechas estudiadas fue *Aph. flos-aquae* la especie dominante, siendo posteriormente sustituida por una codominancia de dos especies pertenecientes al género *Microcystis*: *M. aeruginosa* y *M. flos-aquae*. También se observó un ligero incremento en el número de especies presentes, siendo la diversidad ligeramente mayor en el año 2003 (cinco especies diferentes detectadas en el año 2002, y siete en el 2003).

4.4. Embalse de Santillana.

El de Santillana fue el embalse que se muestreó en mayor número de ocasiones en 9 ocasiones para el punto S1 y 4 veces el S2 en el 2002, en el año 2003 se muestreó en 12 ocasiones el punto S1 y 9 el S2.

4.4.1. Nutrientes.

Este fue el embalse de todos los analizados que alcanzó concentraciones de nutrientes más elevadas, especialmente el fósforo total (Figura I.25).

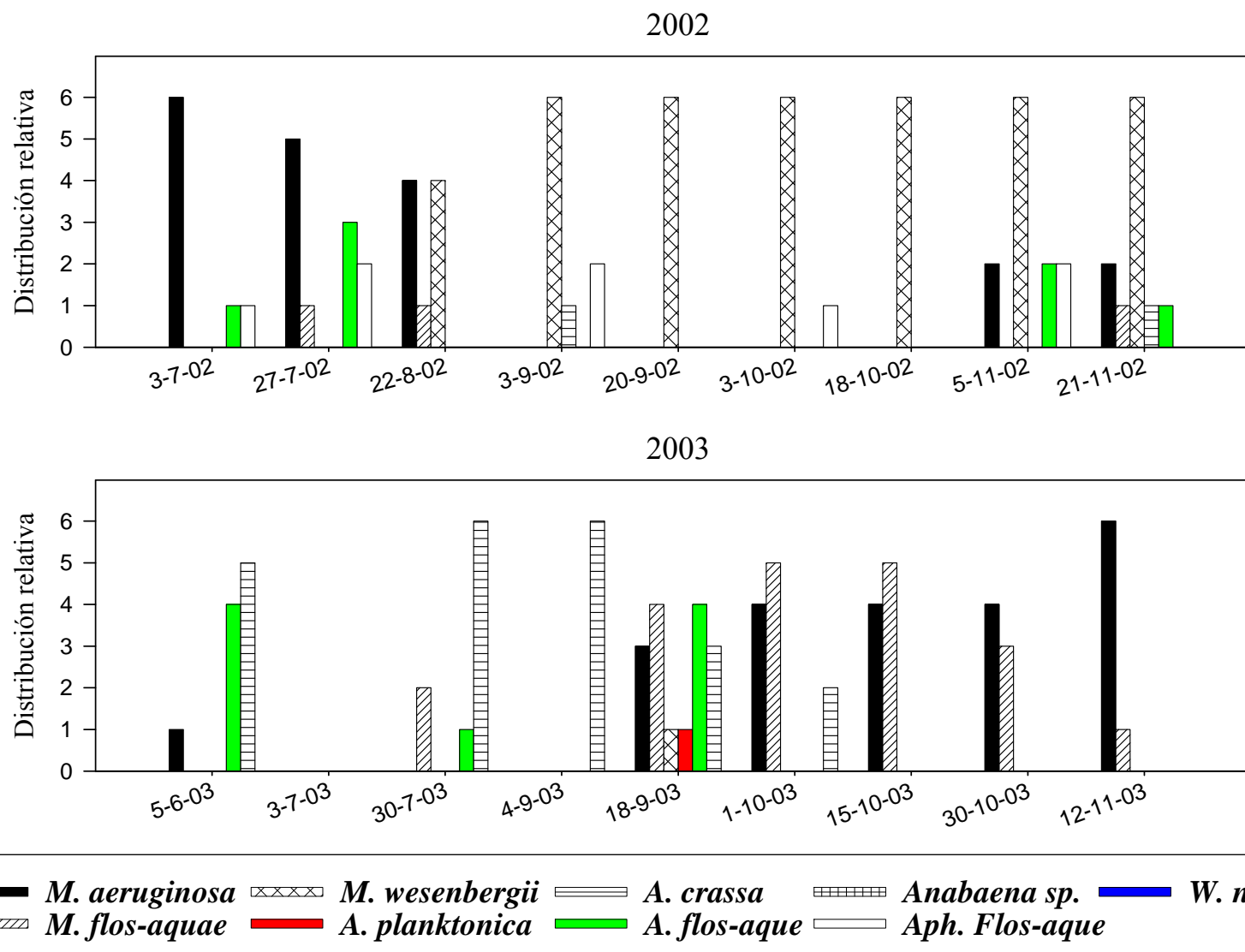


Figura I.24. Distribución relativa de cianobacterias planctónicas presentes en el embalse de El Vellón.

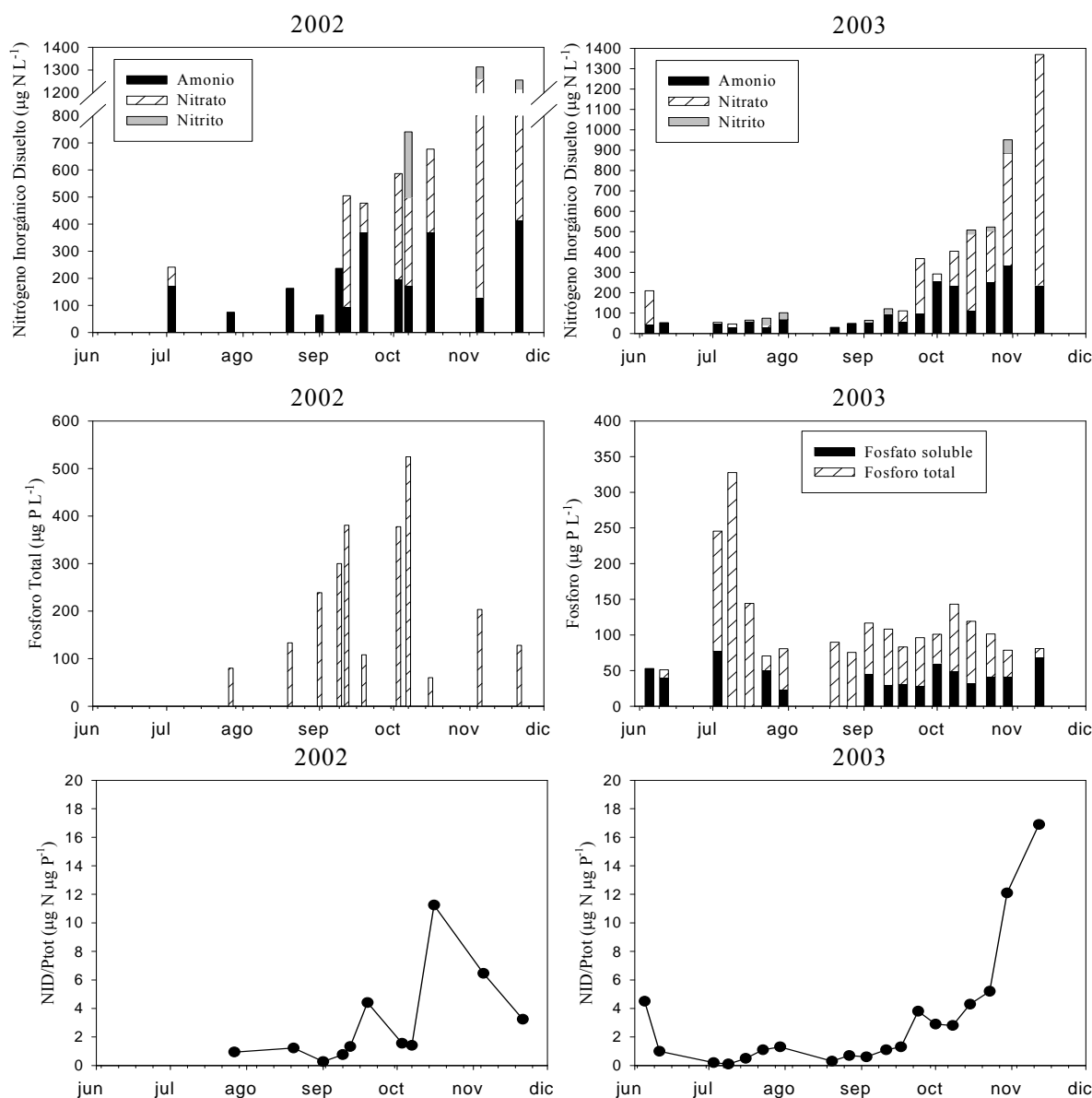


Figura I.25. Concentraciones de nutrientes en el embalse de Santillana. Se muestran las concentraciones de nitrato, nitrito, amonio, fósforo total y relación NID/Ptot para el año 2002 y 2003 y de fosfato soluble para el año 2003.

Nos encontramos con el embalse que presentó la mayor concentración de fósforo total de todos los embalses de la Comunidad de Madrid analizados en este trabajo, los datos de fósforo alcanzan valores máximos superiores a $300 \mu\text{g P L}^{-1}$, Mientras que las concentraciones de nitrógeno inorgánico disuelto se encontraron en niveles similares a los encontrados en otros



embalses. Por otro lado la relación del nitrógeno inorgánico disuelto - fósforo total presentó en los dos años valores dentro del mismo orden de magnitud con máximos superiores a 10.

Cuando analizamos las tendencias que los nutrientes presentaban en cada uno de los años, observamos que estas fueron muy similares en lo que se refiere al nitrógeno inorgánico disuelto, observando un incremento en la concentración a medida que va avanzando la año, alcanzando los máximos al final del periodo de muestreo, en el mes de noviembre, momento en el cual se alcanzaron valores máximos superiores a 1 mg N L^{-1} . Este incremento en el nitrógeno se debió sobre todo al incremento de las concentraciones de nitrato que tiene lugar en ese momento, mientras que el otro compuesto nitrogenado en importancia, el amonio, fue sobre todo importante en los primeros meses analizados. Por otro lado la concentración de fósforo total mostró tendencias completamente diferentes en los dos años, en el 2002 los máximos tuvieron lugar en los meses de septiembre y octubre. El valor medio durante este año fue de $230,5 \mu\text{g P L}^{-1} \pm 149,2 \mu\text{g P L}^{-1}$ y un máximo por encima de $500 \mu\text{g L}^{-1}$. En el año 2003 sin embargo el máximo fue menor encontrándose por debajo de $350 \mu\text{g P L}^{-1}$ y la media del año fue menos de la mitad que la que encontramos en el año anterior, $113,7 \mu\text{g P L}^{-1} \pm 67,7 \mu\text{g P L}^{-1}$, estas diferencias entre los años fueron significativas (t-student $p = 0,02$). La relación nitrógeno inorgánico disuelto - fósforo total mostró máximos y mínimos similares en los dos años (sin diferencias significativas), aunque las tendencias entre los dos fueron ligeramente diferentes mientras que en el año 2003 los valores de la relación comienzan a crecer a principios en el mes de septiembre y alcanzando un valor máximo a finales del mes de octubre. En el año 2003 los valores fueron muy similares durante gran parte del año para luego subir bruscamente en el último muestreo en el mes de noviembre.

4.4.2. Variables físico-químicas.

Las variables en general físico-químicas no muestran grandes diferencias entre los dos años muestreados, los dos únicas que presentan diferencias significativas entre los dos años fueron la conductividad (t-student $p \leq 0,001$) y la turbidez (t-student $p = 0,018$) (Figura I.26). En estos dos casos los valores encontrados en el año 2002 fueron mayores a los del año 2003. Cuando analizamos las tendencias que presentan, podemos observar que en el caso de la



conductividad los valores fueron bastante estables, mientras que la turbidez mostró importantes variaciones en el año 2002, con máximos superiores a 40 NTU, mientras que en el año 2003 los valores fueron más estables a lo largo del año alrededor de 10 NTU.

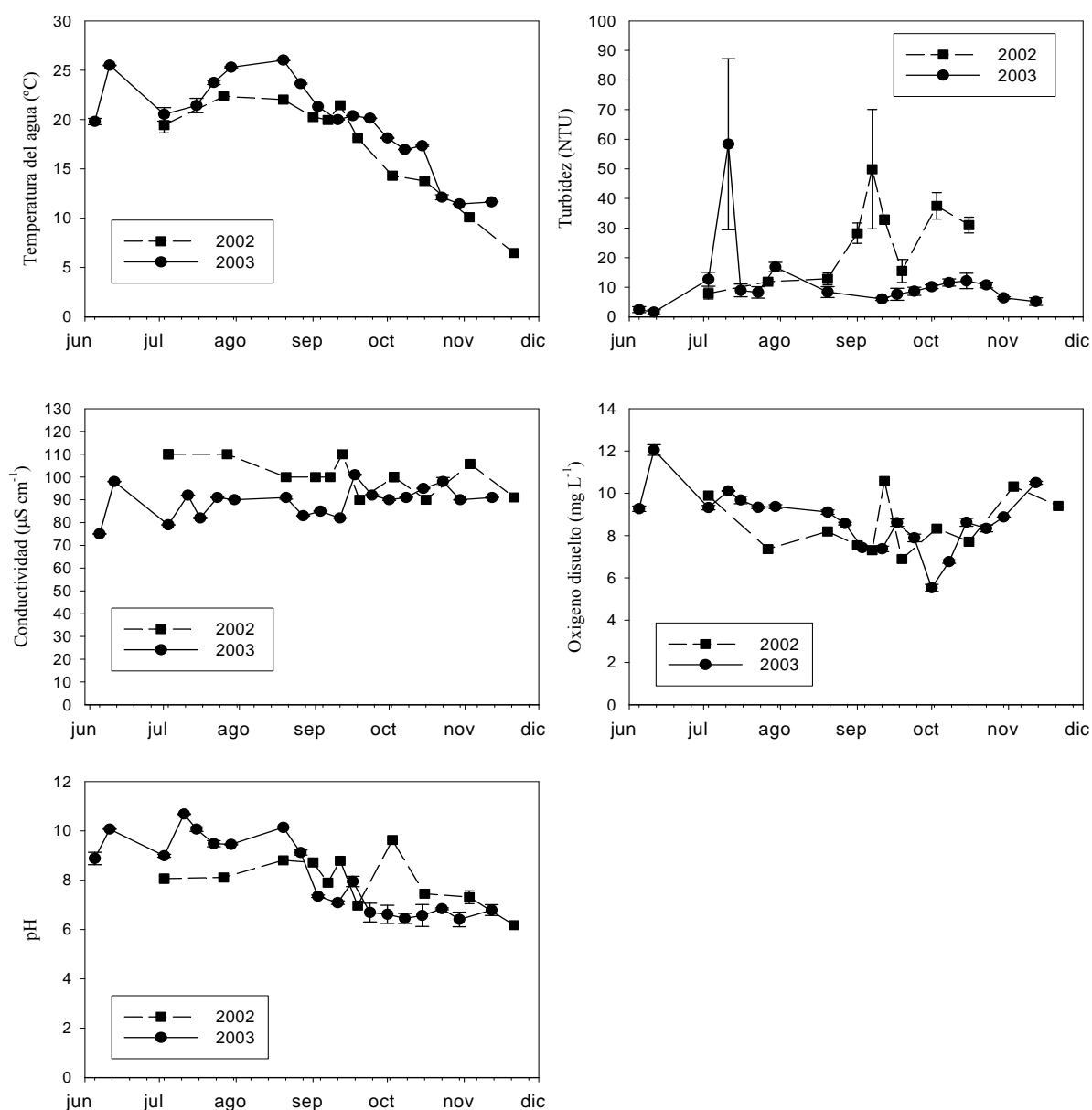


Figura I.26. Variables físico-químicas encontradas en el embalse de Santillana. Se muestran la temperatura del agua, turbidez, conductividad, oxígeno disuelto y pH para el año 2002 y 2003.



Cuando analizamos la tendencias que presenta la temperatura en los dos años analizados podemos ver que a pesar de no existir diferencias significativas, el año 2003 (media = $19,7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4,5\text{ }^{\circ}\text{C}$), parece ligeramente más calido que el año 2002 (media = $17,1\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5,2\text{ }^{\circ}\text{C}$), alcanzando el máximo valor en el año 2003 en el mes de agosto. El resto de las variables no muestran tendencias tan claras como en los otros tres casos. Cuando analizamos el pH observamos tendencias opuestas en el año 2002, los valores máximos se observan en el mes de octubre, mientras que en el año 2003 mostró valores máximos en el mes de julio. Por otro lado el oxígeno disuelto no muestra ninguna tendencia clara manteniéndose con valores de máximos en momentos puntuales a lo largo del periodo de muestreo.

4.4.3. *Clorofila a y fitoplancton.*

En el embalse de Santillana se alcanzaron las mayores concentraciones de clorofila *a* cuando comparamos los valores con el resto de los embalses analizados, aunque se observaron grandes variaciones tanto en la concentración máxima, como en el patrón de aparición entre los dos años estudiados. Por el contrario, el tipo de cianobacterias que estuvieron presentes fueron más estables.

El punto S1 en el año 2002 presentó las concentraciones de clorofila *a* más elevadas de todos los embalse analizados en la Comunidad de Madrid, con concentraciones máximas superiores $120\text{ }\mu\text{g Clo } a\text{ L}^{-1}$ (Figura I.27). Junto con estos picos de biomasa (medida como clorofila *a*) tan elevados, este embalse muestra grandes variaciones en la concentración en un periodo de tiempo muy corto. Así, que la concentración de clorofila *a* llega a multiplicarse por 10 en el plazo de 15 días. La media de clorofila *a* en el punto S1 durante el año 2002 fue de $91,96 \pm 73,88$ (mas de un 80% de variación media) con una diferencia entre el valor superior e inferior de $211,6\text{ }\mu\text{g Clo } a\text{ L}^{-1}$. Cuando analizamos las tendencias que presenta la clorofila podemos observar 4 picos importantes entre los meses de septiembre y noviembre con grandes valles entre estos picos de biomasa.

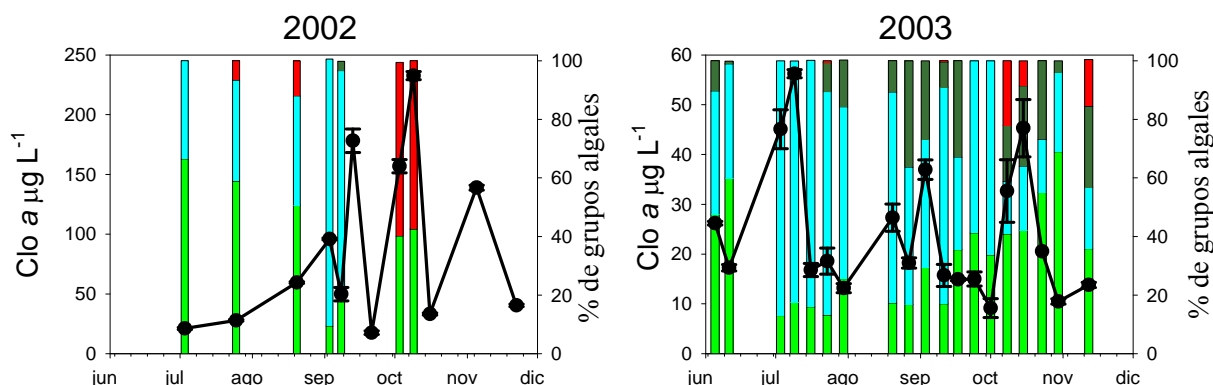


Figura I.27. Concentraciones de clorofila *a* y porcentaje de grupos algales en el punto S1 del embalse de Santillana. Se muestran las concentraciones de clorofila *a* determinadas mediante extracción metanólica (línea continua) y % de esa clorofila *a* (barras) que pertenece a cada uno de los cuatro grupos algales (algas verdes (verde), cianobacterias (azul), diatomeas (marrón) y criptofitas (rojo) determinada por métodos fluorométricos. Nótese la diferencia en la escala del eje Y.

El año 2003 (Figura I.27), mostró concentraciones claramente inferiores a las que encontramos el año anterior, la concentración máxima encontrada fue ligeramente superior a $50 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$ y la media anual fue de $24,08 \pm 13,4$. Estas diferencias en la concentración de clorofila *a* entre los dos años fueron estadísticamente significativas (test Mann-Whitney. $p \leq 0,001$). También fueron diferentes las tendencias observadas encontrándose el pico máximo de biomasa en el mes de Julio. Cuando analizamos los grupos algales presentes, en el 2003 el pico máximo de clorofila *a* coincidió con el momento en el que las cianobacterias fueron más importantes en la población fitoplactónica, por otro lado en el año 2002 el pico de clorofila coincidió con un momento de dominancia de criptofitas, pero aunque la importancia de este grupo algal pudo ser observado mediante análisis microscópico, también nos indicó que las cianobacterias fueron el grupo más importante, y que el sistema fluorométrico falló.

Los tipos de cianobacterias planctónicas presentes en el embalse de Santillana durante los dos años analizados en el punto S1 (figura I.28), presentan poca diversidad en cuanto al



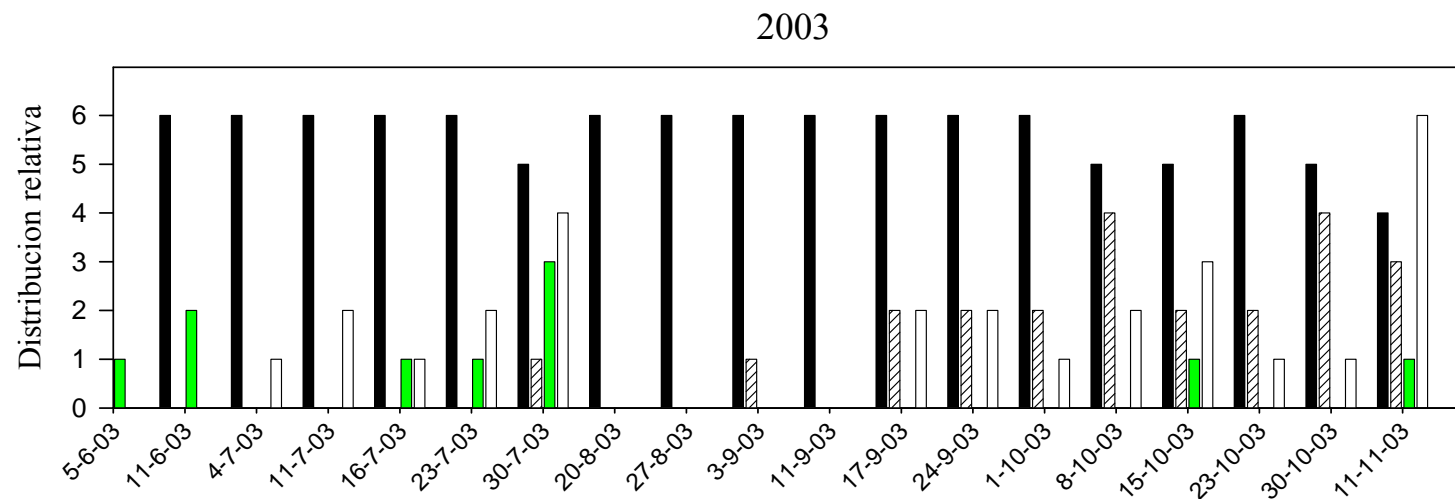
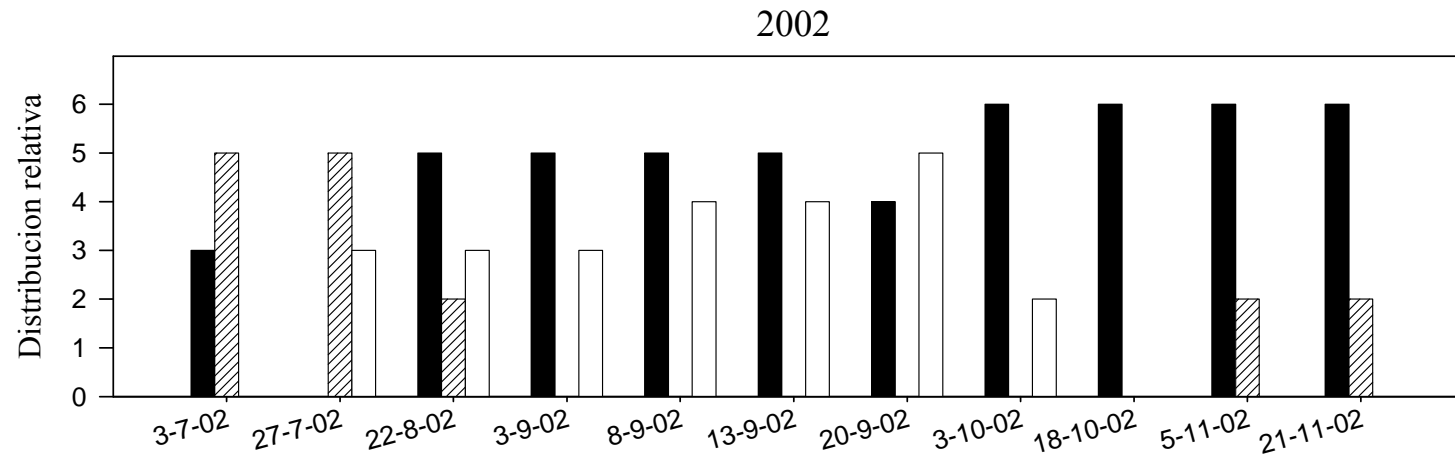
número de especies de cianobacterias planctónicas, encontrando sólo tres especies de cianobacterias en el año 2002 y cuatro especies diferentes en el año 2003. En los dos años analizados una misma cianobacteria dominó durante la mayor parte del periodo de muestreo: *M. aeruginosa*. En el año 2002 fue dominante en el 73% de los muestreos, todos los realizados desde finales del mes de agosto hasta el final del periodo de muestreo en el mes de noviembre, valor similar al encontrado en el año 2003 que fue dominante en el 89% de ellos, todos los realizados salvo el primero y el último muestreo. Las otras dos especies de cianobacterias que siguieron a *M. aeruginosa* en orden de importancia fueron *Aph. flos-aquae* y *M. flos-aquae*, que estuvieron presentes en más del 45% de los muestreos en el año 2002 y en más del 55% de las muestras analizadas en el año 2003. La última especie que apareció en este embalse fue *A. flos-aquae*, que apareció únicamente en el año 2003 en siete ocasiones aunque siempre mostró importancia marginal dentro de la población cianobacteriana.

4.5. Embalse de Valmayor.

El embalse de Valmayor fue el único embalse junto con el de Santillana donde la clorofila *a* alcanzó máximos elevados en los dos años objeto de estudio.

4.5.1. Nutrientes.

Las concentraciones de nutrientes observadas en el embalse de Valmayor en los dos años fueron similares, con máximos de nitrógeno inorgánico disuelto y fósforo total similares. Sin embargo las tendencias observadas a lo largo del año fueron ligeramente diferentes (Figura I.29).



■ *M. aeruginosa* ▨ *M. wesenbergii* ▤ *A. crassa* ▧ *Anabaena sp.* ■ *W. naegliana*
 ▩ *M. flos-aquae* ■ *A. planktonica* ■ *A. flos-aque* ▨ *Aph. Flos-aque*

I.28. Distribución relativa de cianobacterias planctónicas presentes en el embalse de Santillana.



Las concentraciones de nitrógeno inorgánico disuelto alcanzaron valores muy similares en los dos años con máximos de alrededor de $800 \mu\text{g L}^{-1}$, las tendencias sin embargo fueron ligeramente diferentes, siendo los valores en el año 2003 ligeramente superiores a principios de periodo de muestreo. Este incremento se debió sobre todo a la concentración de nitrato, que estuvo presente en este momento del año 2003, mientras que no fue posible detectarlo al principio del periodo de muestreo en el año 2002. Esta mayor concentración de nitrógeno en la primera parte del periodo analizado se extiende aunque en menor medida hasta principios del mes de octubre. Si hacemos la media de NID encontrado hasta finales del mes del septiembre en los dos años analizados, encontramos que el valor medio en el año 2002 ($57,1 \pm 26,9$) fue casi tres veces mayor que el encontrado en el año 2003 ($151,5 \pm 127,6$), aunque la variabilidad que presenta impide que las diferencias encontradas sean significativas.

El fósforo total presentó valores y tendencias similares en ambos años, con excepción junio y julio, periodo para el cual no existen datos en para el año 2002, lo que impide comprobar si existieron diferencias en el valor máximo alcanzado en este primer periodo, cosa que ha ocurrido con el nitrógeno inorgánico disuelto. Por otro lado en el caso del fosfato soluble, analizado únicamente en el año 2003, podemos observar que sólo fue detectado en 5 de los muestreos realizados, siendo el componente mayoritario del fósforo total en tres de las ocasiones: al principio, al final del periodo de muestreo y a principios del mes de octubre. Finalmente los valores de la relación NID/Ptot muestran valores completamente diferentes en los dos años. El en año 2003 se observaron valores superiores a los existentes en el año 2002, estas diferencias fueron significativas, incluso cuando se elimino del análisis el periodo de tiempo para el cual no existían datos para el año 2002 (test Mann-Whitney, $p = 0,003$). Estas se ven aun con más claridad cuando se comparan los valores máximos encontrados, en el año 2002 el máximo fue inferior a 1 y en el año 2003 fue un orden de magnitud superior 9,9.

4.5.2. Variables físico-químicas.

Los variables físico-químicas, fueron durante los dos años, salvo en el caso de la conductividad, bastante similares (Figura I.30). La temperatura alcanzó el máximo en el mes de agosto para posteriormente ir descendiendo progresivamente hasta alcanzar valores ligeramente superiores a 10°C . En el caso de la turbidez salvo por la falta de datos en la parte final del periodo de muestreo del año 2002 fueron similares tanto en valores y tendencias. Tanto el oxígeno disuelto, como el pH presentaron valores similares, si bien en el caso del



oxígeno disuelto no es posible observar ninguna tendencia clara, mientras que en el caso del pH se observa un máximo a principios del periodo de muestreo para posteriormente ir bajando. Los valores de conductividad como ya hemos indicado fueron muy diferentes, mostrando valores muy superiores en el año 2003, respecto al año 2002, siendo las diferencias significativas (t-student, $p = 0,005$).

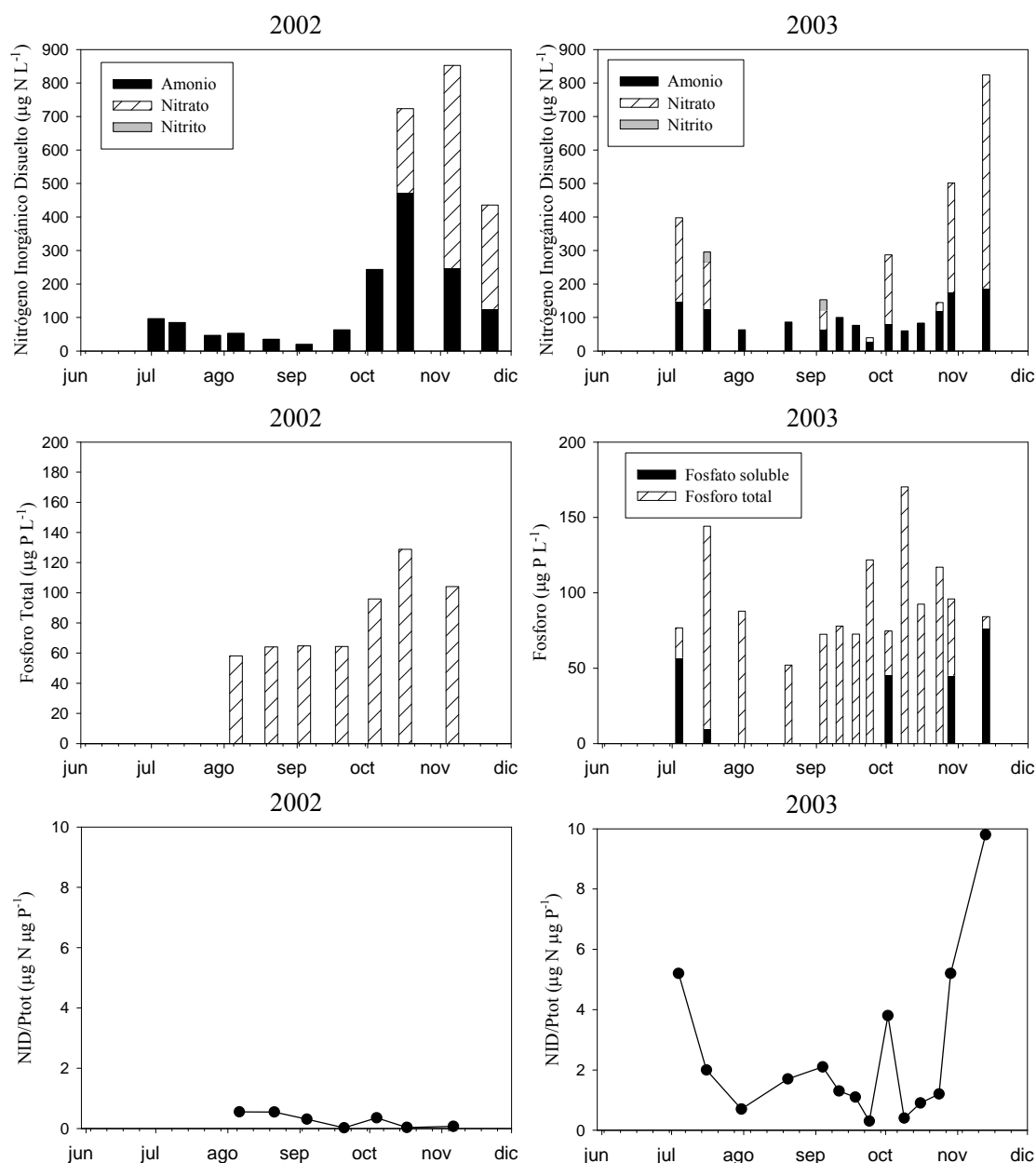


Figura I.29. Concentraciones de nutrientes en el embalse de Valmayor. Se muestran las concentraciones de nitrato, nitrito, amonio, fósforo total y relación NID/Ptot para el año 2002 y 2003 y de fosfato soluble para el año 2003.

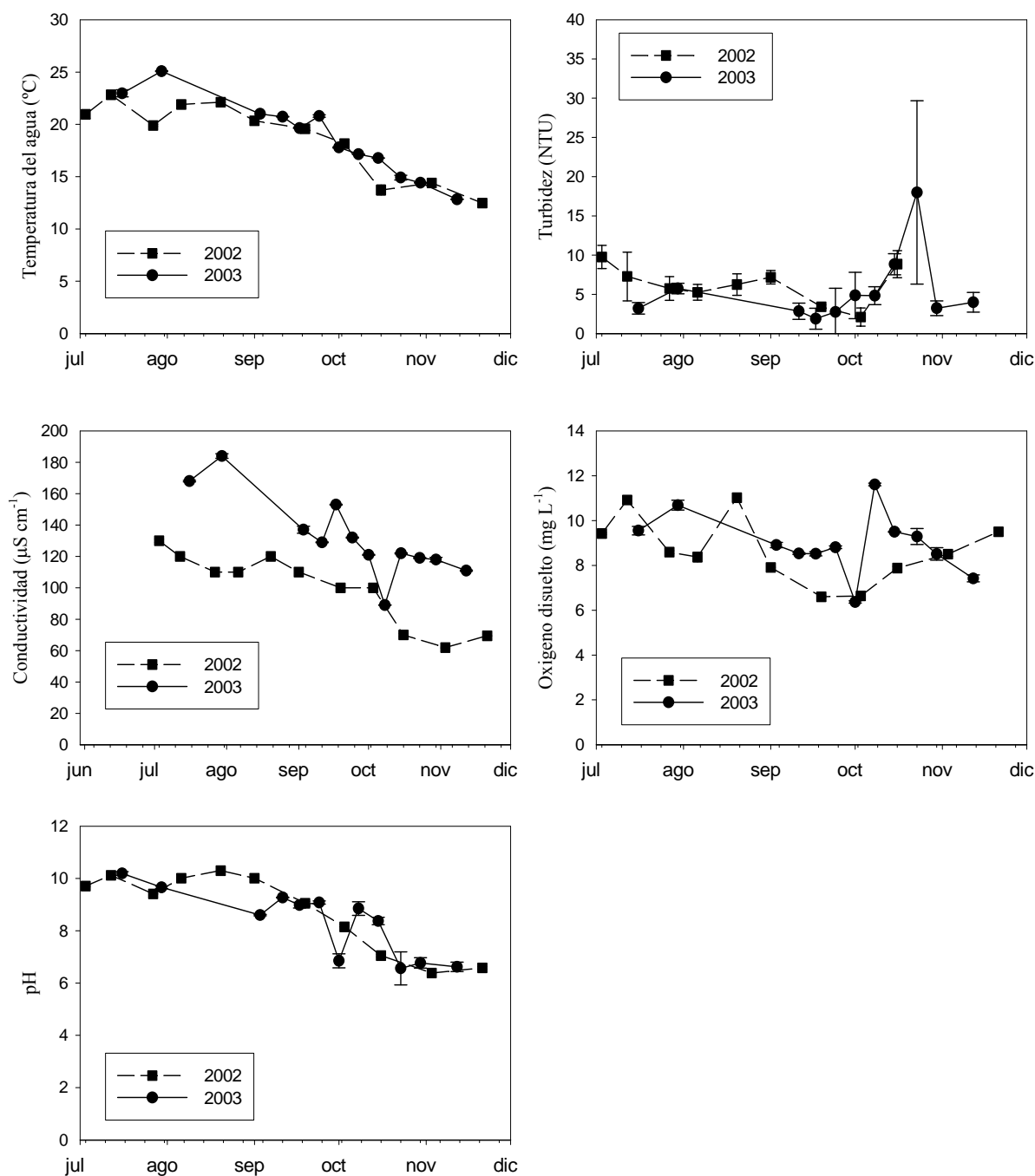


Figura I.30. Concentraciones de nutrientes en el embalse de Valmayor. Se muestran las concentraciones de nitrato, nitrito, amonio, fósforo total y relación NID/Ptot para el año 2002 y 2003 y de fosfato soluble para el año 2003.



4.5.3. Clorofila *a* y fitoplancton.

En el embalse de Valmayor encontramos concentraciones elevadas de clorofila *a* en los dos años estudiados, observándose de manera puntual concentraciones superiores a $50 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$. Las concentraciones medias durante el periodo de muestreo en el punto V1 (Figura I.31) (el punto analizado en todas las ocasiones y en los dos años) fueron ligeramente superiores en el año 2002 ($33,3 \pm 23,1 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$) que en el año 2003 ($25,5 \pm 17,3 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$) en el año aunque estas no fueron significativas. Los máximos encontrados en los dos años fueron en este embalse también muy similares $80 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$ en el año 2002 y $60 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$ en el 2003. Cuando analizamos el patrón de presentó la clorofila *a* en ambos años sí podemos observar claras diferencias entre los dos. En el año 2002 las mayores concentraciones de clorofila *a* aparecieron en la primera parte del periodo de muestreo, alcanzándose el máximo en el mes de agosto siendo no observándose variaciones bruscas en la clorofila *a*. Mientras que en el año 2003 las concentraciones máximas de clorofila *a* se alcanzaron en los meses de septiembre y octubre periodo en el cual se observaron variaciones de hasta 6 veces en un periodo de dos semanas.

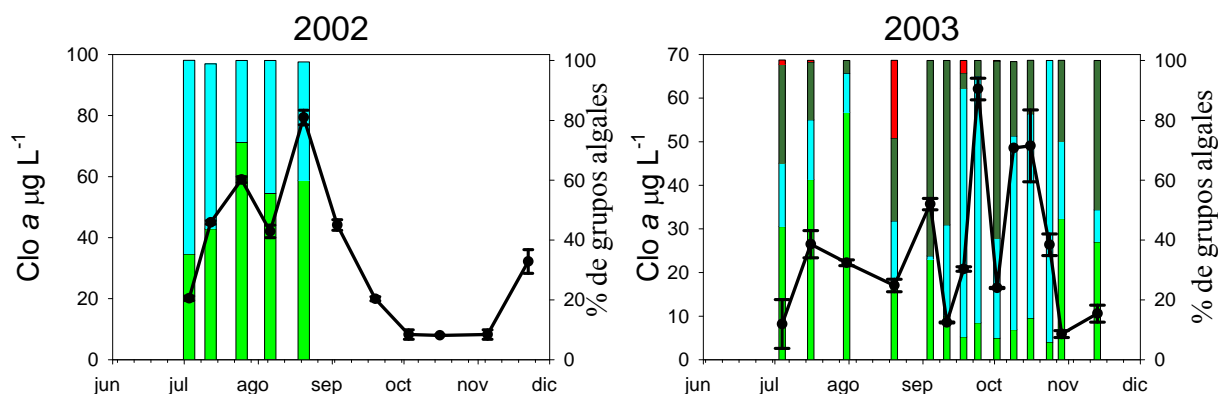


Figura I.31. Concentraciones de clorofila *a* y porcentaje de grupos algales en el embalse de Valmayor. Se muestran las concentraciones de clorofila *a* determinadas mediante extracción metanólica (línea continua) y % de esa clorofila *a* (barras) que pertenece a cada uno de los cuatro grupos algales (algas verdes (verde), cianobacterias (azul), diatomeas (marrón) y criptofitas (rojo) determinada por métodos fluorométricos. Nótese la diferencia en la escala del eje Y.



Respecto a las especies de cianobacterias planctónicas que aparecieron, nos encontramos ante el embalse que menor cantidad de especies diferentes presentó (Figura I.32). En ambos años sólo fue posible detectar las tres especies, y estas fueron las mismas: *M. aeruginosa*, *M. flos-aquae* y *Aph. flos-aquae*. Sin embargo si se modificó la cianobacteria dominante en cada uno de los años. En el año 2002, la especie que dominó en ocho de los muestreos (72,7% del total) fue *Aph. flos-aquae*, mientras que en el año 2003 la especie que dominó la población de cianobacterias en un mayor número de ocasiones fue *M. aeruginosa* que también dominó la población en ocho de los muestreos realizados (57%). Cuando analizamos más en profundidad en qué en ambos años las dos especies dominantes se comportaron de manera similar en los dos años. En el año 2002 *Aphanizomenon* dominó desde principios del periodo de muestreo hasta el final, mientras que *M. aeruginosa* estuvo presente en cantidades poco importantes hasta el mes de septiembre, momento en que fue sustituida por *M. flos-aquae* que terminó dominando la población de cianobacterias al final del periodo. En el año 2003 *M. aeruginosa* dominó desde el principio del periodo de muestreo, hasta finales del mes de septiembre, momento en el que fue sustituido como dominante por *Aph. flos-aquae* que dominó durante parte del mes de octubre para ser posteriormente sustituida de nuevo por *M. aeruginosa*.

4.6. Embalse de San Juan.

El embalse de San Juan situado en la zona noroeste de la Comunidad de Madrid fue en el mismo número de ocasiones en los dos años: 9.

4.6.1. Nutrientes.

El punto SJ situado en el embalse de San Juan mostró en general bajas concentraciones de nutrientes en los dos años, siendo estas especialmente bajas en el año 2002 (Figura I.33).

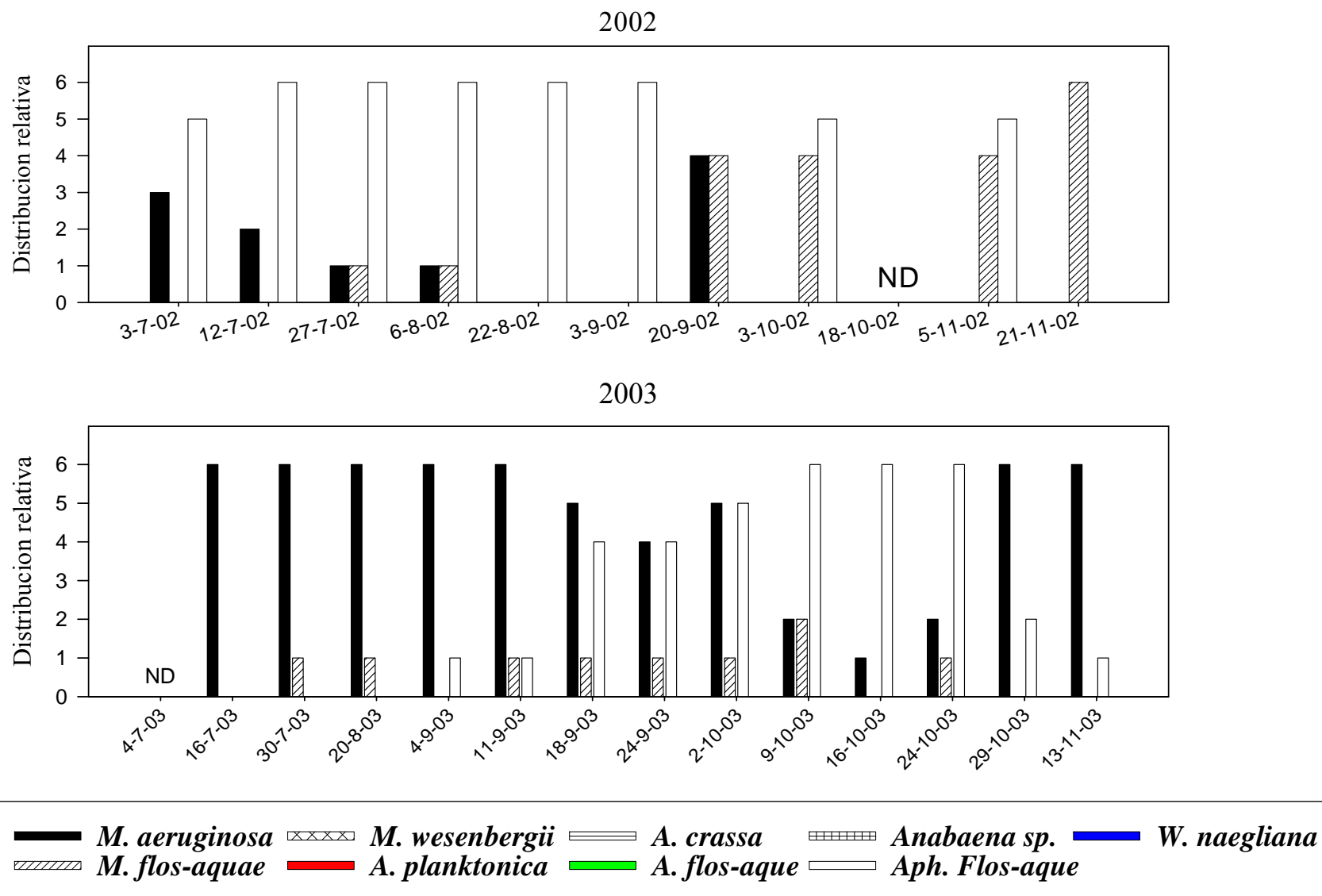


Figura I.32. Distribución relativa de cianobacterias planctónicas presentes en el embalse de Valmayor. ND = No detectado.

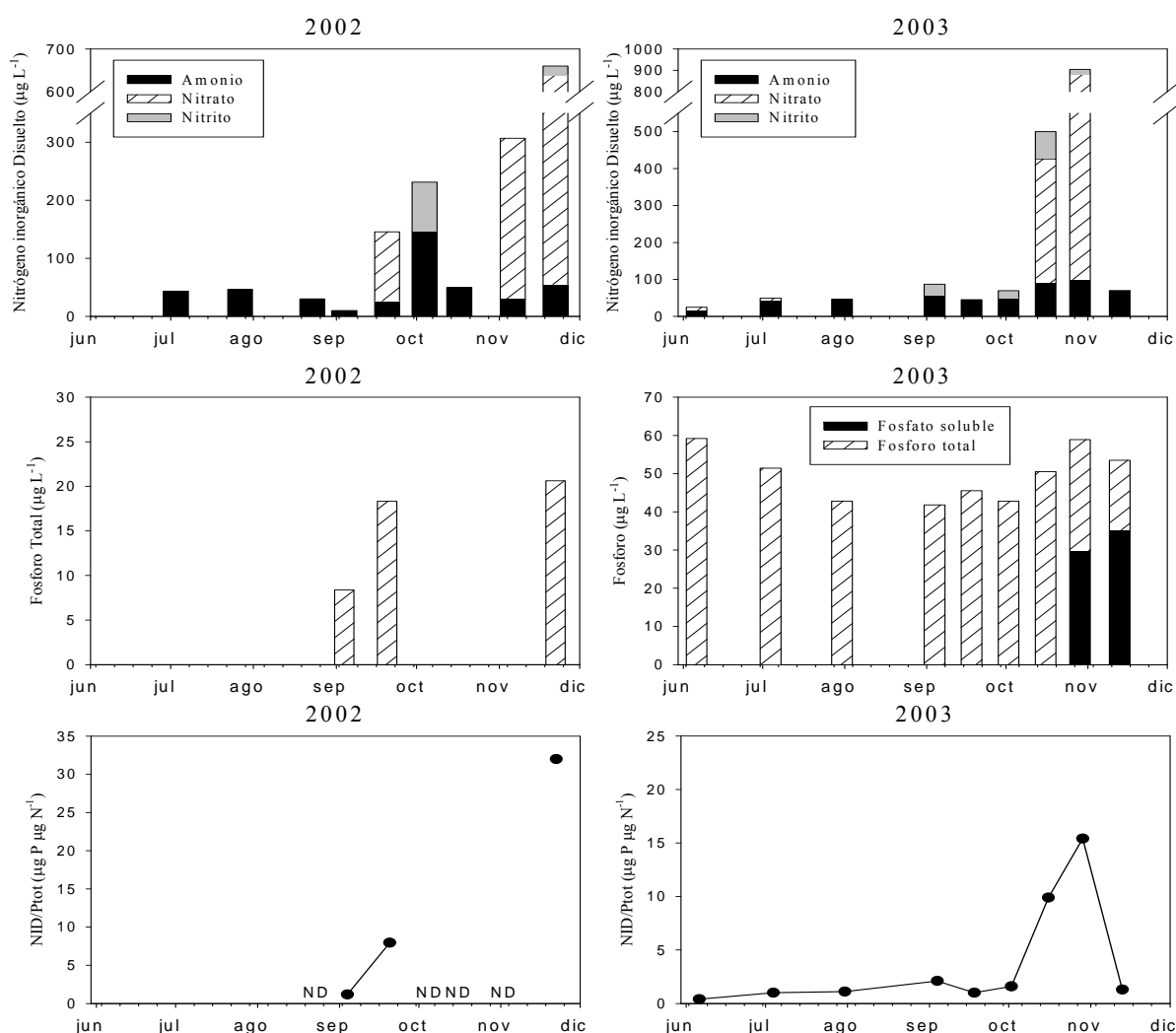


Figura I.33. Concentraciones de nutrientes en el embalse de San Juan. Se muestran las concentraciones de nitrato, nitrito, amonio, fósforo total y relación NID/Ptot para el año 2002 y 2003 y de fosfato soluble para el año 2003. ND = no determinado.

Cuando analizamos los nutrientes encontrados en el embalse en cada uno de los años estudiados observamos que las concentraciones de nitrógeno inorgánico se encontraron entre las más bajas encontradas en los embalses analizados, e incluso con la entrada de nutrientes que se suele producir cuando se rompe la termoclina, los valores máximos alcanzados fueron de inferiores a $700 \mu\text{g N L}^{-1}$. Las concentraciones de fósforo total en el año 2002 se encontraron salvo en tres ocasiones por debajo del límite de detección y los valores máximos alcanzados fueron los más bajos detectados en todos los embalses, alrededor de $20 \mu\text{g P L}^{-1}$. Dado los valores encontrados bajo nuestro límite de detección, sólo se pudo calcular la relación DIN – Ptot sólo en tres ocasiones, en las cuales presentaron valores muy divergentes: 1,2, 7,9 y



31,9. Los nutrientes en el año 2003 también fueron bajos, pero más próximos a los detectados en otros embalses. El fósforo total fue posible detectarlo en todos los muestreos, presentando valores ligeramente superiores a $40 \mu\text{g P L}^{-1}$ (dos veces superior a valor máximo detectado en el año 2002) y manteniéndose más o menos estable a lo largo del año. El nitrógeno inorgánico sin embargo no presentó valores más elevados a los detectados en año anterior presentándose valores máximos superiores a $500 \mu\text{g N L}^{-1}$ en el mes de octubre, coincidiendo los máximos con las dos únicas ocasiones en las que fue posible detectar el nitrato. La relación DIN- P_{tot} pudo determinarse durante todo periodo de muestreo, mostrando generalmente valores alrededor de 2, si bien la relación subió de manera clara cuando se produjo la inyección de nitrato presentando valores en ese momento de 9,9 y 15,4. El fosfato inorgánico únicamente se detectó en los dos últimos muestreos del año 2003 representando al menos el 50% del fósforo total.

4.6.2. Variables físico-químicas.

Las variables físico-químicas presentaron valores y tendencias muy similares en los dos años muestreados (Figura I.34). La temperatura se comportó de manera similar a la encontrada en el resto de los embalses con valores máximos superiores a 24°C alcanzados en agosto, momento a partir del cual comenzó a disminuir progresivamente hasta valores inferiores a 15°C en el mes de noviembre. La turbidez mostró valores bajos, inferiores 15 NTU . La conductividad se comportó de manera diferente en los dos años analizados en el año 2003 se mantuvo más o menos estable alrededor de $70 \mu\text{S cm}^{-1}$. Mientras que en 2002 presentó un salto en los valores observados entre los meses de Julio y agosto, en el mes de julio, presentó valores de $90 \mu\text{S cm}^{-1}$, para caer a partir de siguiente muestreo a valores similares a los encontrados en el año 2003. La concentración de oxígeno presentó valores máximos al principio del periodo en estudio, aunque las tendencias posteriores fueron ligeramente diferentes entre los años, en el año 2002 encontramos se mantuvieron más o menos estables hasta el final del periodo analizado. Mientras que en el 2003, el patrón fue menos estable con picos de concentración importantes en junio septiembre. Finalmente, el pH también muestra una tendencia a disminuir a lo largo del periodo de muestreo, alcanzando el máximo, cercanos a 10, en junio o julio y mínimos, alrededor de 7, en el mes de noviembre.

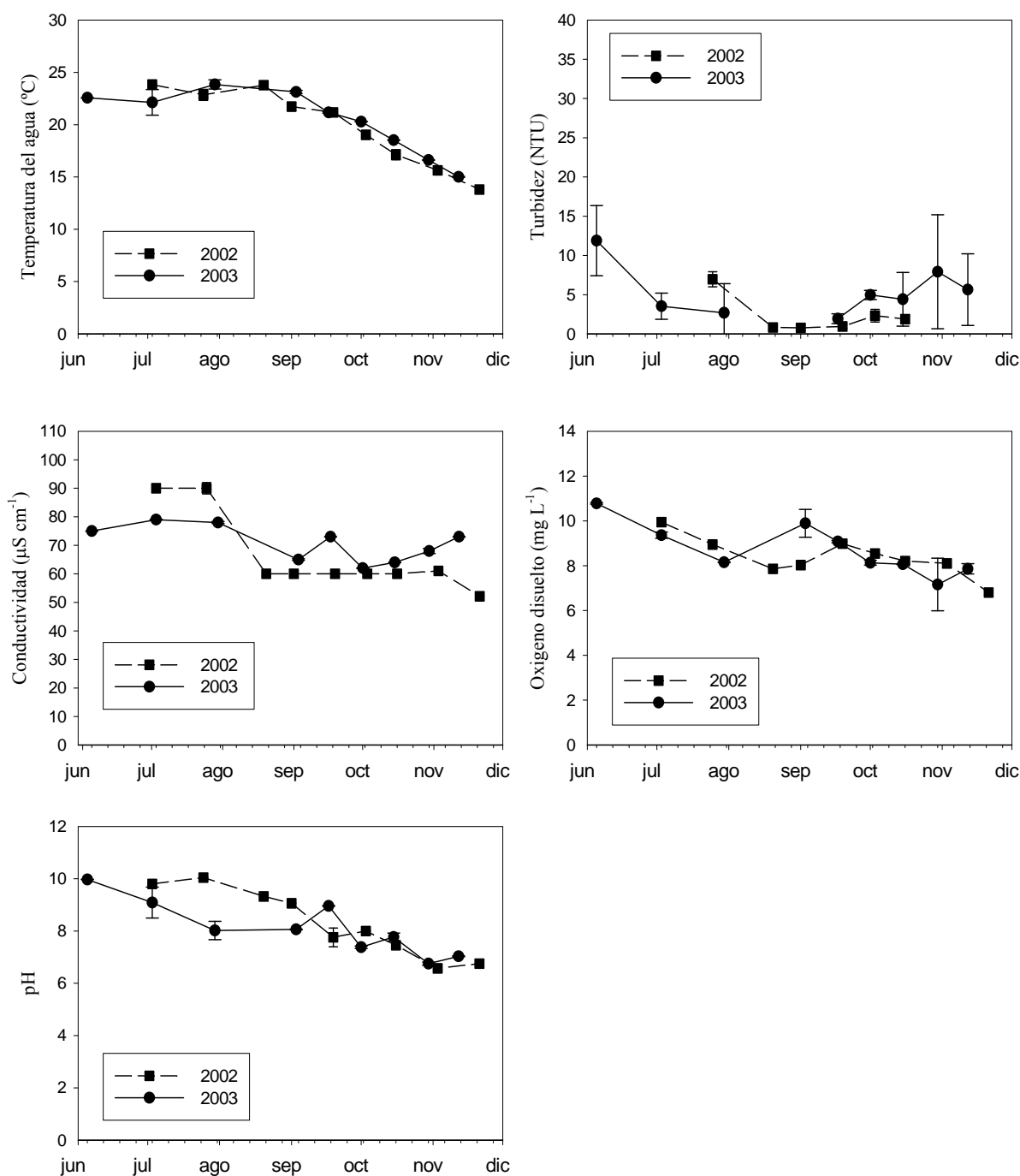


Figura I.34. Variables físico-químicas analizadas en el embalse de San Juan. Se muestran la temperatura del agua, turbidez, conductividad, oxígeno disuelto y pH para el año 2002 y 2003.



4.6.3. Clorofila *a* y fitoplancton.

En el embalse de San Juan se ha encontrado concentraciones de clorofila *a* relativamente bajas, similares a las encontradas en los embalses de El Vellón y Río Sequillo. El máximo en ambos años fue similares, inferiores a $30 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$ (Figura I.34). Las concentraciones medias de clorofila *a* sin embargo fueron ligeramente diferentes en los dos años. En el año 2003, fueron ligeramente inferiores a las encontradas en el año 2002; $13,8 \pm 8,9 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$ en el año 2002 por $10,3 \pm 5,6 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$. Respecto a la importancia de los diferentes grupos algales observamos que las cianobacterias fueron el grupo algal más importante, con una media del $46\% \pm 30\%$ en el año 2002 y $41\% \pm 24\%$ en el año 2003, el segundo grupo en importancia sin embargo varió entre los dos años. En el año 2002, fueron las algas verdes con valores de $29\% \pm 20\%$ y en el año 2003 las diatomeas con valores de $32\% \pm 23\%$. Cuando comparamos el momento en que se alcanzó la concentración máxima de clorofila *a* con cuando las cianobacterias alcanzaron mayor preponderancia en la población fitoplanctónica, vemos ligeras diferencias entre los dos años, en el año 2002, las cianobacterias fueron importantes representando en ese momento como mínimo del 40% de la población pero no fue el grupo dominante que fueron las algas verdes, mientras que en el año 2003 representaron el 69% de la población cuando se alcanzó la concentración de clorofila *a* más alta.

Finalmente, en lo relativo a las especies de cianobacterias (Figura I.35) en el año 2002 se encontraron mediante estudio microscópico cinco especies diferentes, de estas, dos pertenecieron al género *Microcystis*: *M. aeruginosa* y *M. flos-aquae*, otras dos al género *Anabaena*: *A. flos-aquae* y una especie que no fue posible identificar y finalmente una al género *Aphanizomenon*: *Aph. flos-aquae*. Mientras en el 2003 la diversidad de cianobacterias fue ligeramente mayor siendo posible identificar siete especies diferentes, las cuatro identificadas a nivel de especie el año anterior y otras tres *W. naegeliana*, *A. plaktonica* y *A. crassa*.

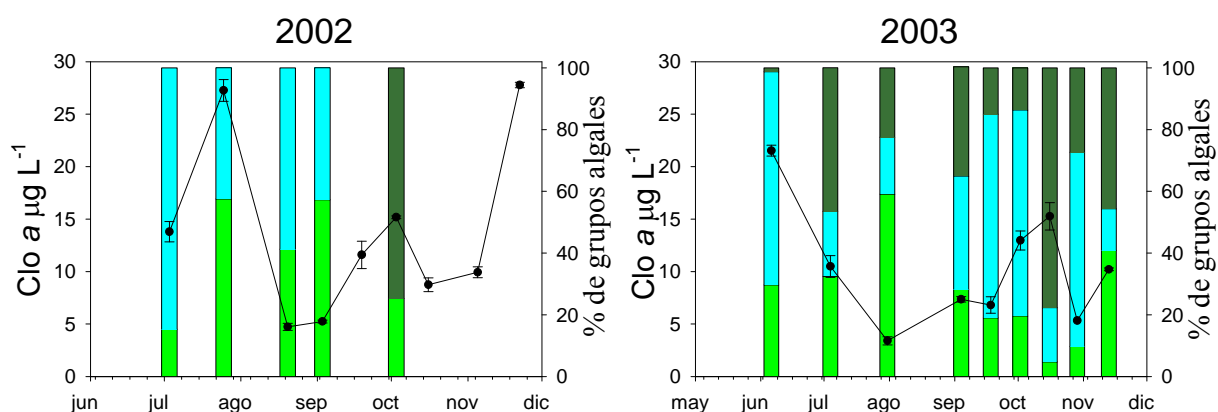


Figura I.35. Concentraciones de clorofila *a* y porcentaje de grupos algales en el embalse de San Juan. Se muestran las concentraciones de clorofila *a* determinadas mediante extracción metanólica (línea continua) y % de esa clorofila *a* (barras) que pertenece a cada uno de los cuatro grupos algales (algas verdes (verde), cianobacterias (azul), diatomeas (marrón) y criptofitas (rojo) determinada por métodos fluorométricos.

Durante el año 2002 (Figura I.36) la especie dominante fue *M. aeruginosa*, que dominó en 7 de las ocasiones analizadas desde el mes de agosto al mes de noviembre. La otra especie que en importancia durante este año, fue *Aph. flos-aquae* que aunque sólo dominó la población en una ocasión, como hizo *A. flos-aquae*, fue la segunda especie de importancia en número de ocasiones en las que apareció con cuatro. Las otras dos especies presentes durante este año fueron *Anabaena* sp. y *M. flos-aquae* que se encontraron en el mes de noviembre.

En el año 2003 (Figura I.36) al igual que en el año anterior la especie más importante fue *M. aeruginosa* aunque su importancia global en la comunidad disminuyó ligeramente. Si cambió sin embargo la segunda especie en importancia, esta fue *A. flos-aquae* que dominó la población en dos ocasiones y fue codominante en otras dos. En general durante este año en el embalse de San Juan parece aumentar la importancia del orden Nostocales sobre Chroococales dominante el año anterior, puesto que aparecieron dos especies del género *Anabaena* que no se detectaron el año anterior *A. crassa* y *A. planktonica*, mientras *M. flos-aquae* que en el 2002 tuvo cierta importancia, en este año se presentó durante todo el periodo analizado pero sólo de manera marginal. Finalmente *Aph. flos-aquae* también disminuyó su importancia, dejando de dominar la población de cianobacterias en las fechas analizadas.

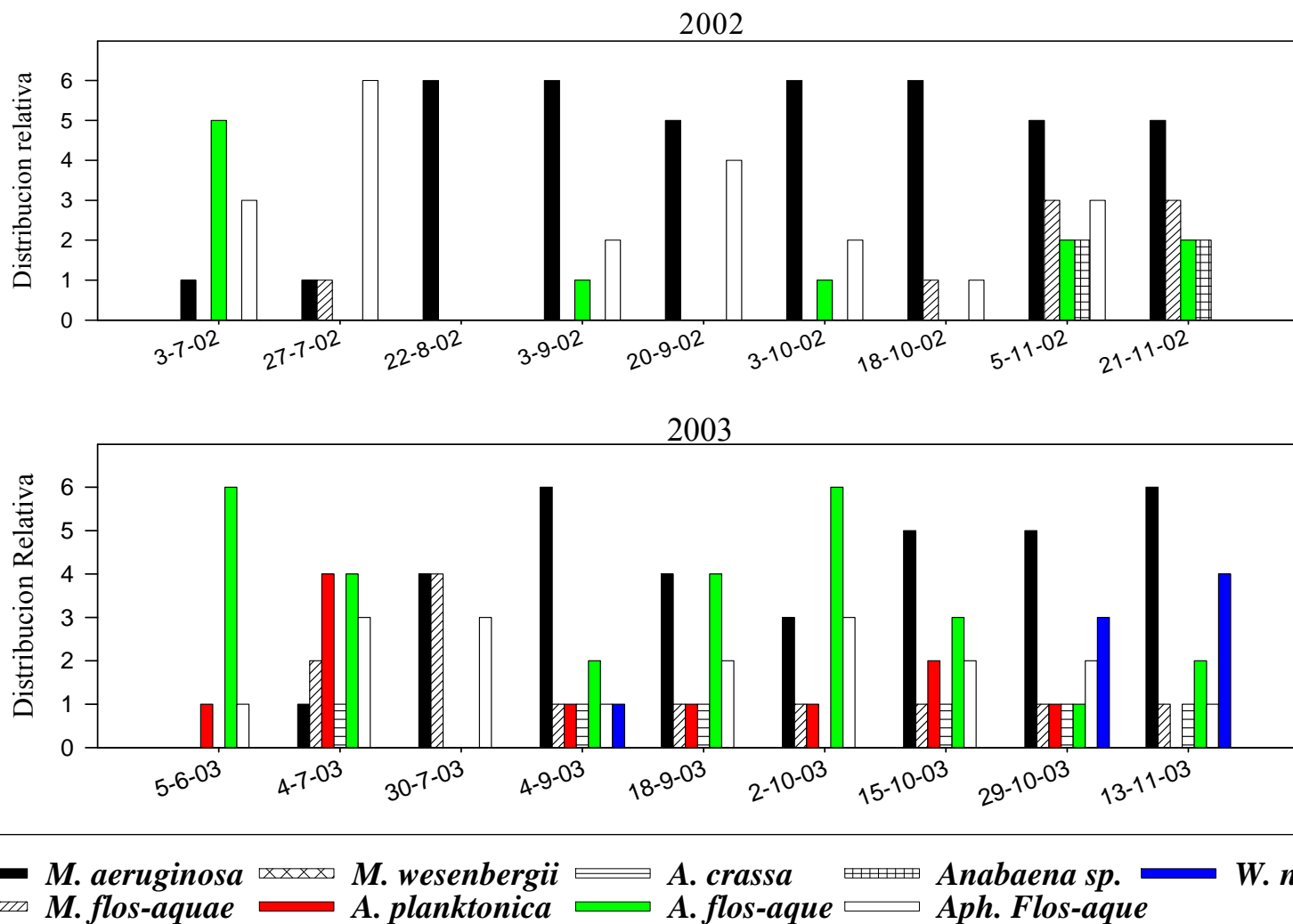


Figura I.36. Distribución relativa de cianobacterias planctónicas presentes en el embalse de San Juan.



4.7. Embalse de Picadas.

El embalse de Picadas se encuentra situado aguas abajo del embalse de San Juan muestreado en el punto P1 en 8 ocasiones en el año 2002 y en 14 ocasiones en el punto P1 y en 8 ocasiones el punto P2 en el año 2003.

4.7.1. Nutrientes.

Cuando analizamos la concentración de nutrientes en el punto P1, que fue muestreado en los dos años estudiados, observamos que en general las concentraciones de nutrientes fueron ligeramente mayores en el año 2003, que en el año 2002. (Figura I.37). En cuanto a como se comportó el nitrógeno inorgánico disuelto, vemos que las concentraciones medias fueron similares ($305 \pm 317 \mu\text{g N L}^{-1}$) en el año 2002 y en el año 2003 ($342 \pm 396 \mu\text{g N L}^{-1}$), aunque los máximos alcanzados si parece diferentes. En el año 2003 este fue casi dos veces superior al que presentó el año 2002. El fósforo total por otro lado si muestra diferencias significativas (t-student $p = 0,01$) en el año 2002 la media fue de $23,8 \pm 23 \mu\text{g P L}^{-1}$ y en 2003 dos veces más alto $56,7 \pm 26,6 \mu\text{g P L}^{-1}$. Además, cuando analizamos el patrón que presentaron las concentraciones de este compuesto, observamos que también parecen existir claras diferencias. El año 2002 se caracteriza por presentar grandes variaciones a lo largo del año. Mientras que en año 2003 las concentraciones se mantuvieron más o menos estables a lo largo del periodo analizado. El fósforo soluble, que únicamente se analizó en el año 2003, tuvo especial importancia al final del periodo objeto de análisis, momento en el cual representó la mayor parte de del fósforo total presente. La relación DIN – P_{tot} durante el año 2002 mostró valores muy diferentes: desde valores inferiores a 2 hasta valores superiores a 45. Mientras el año 2003 presentó un rango más estrecho con valores máximos de 16,7 y mínimos de 1,1.

Cuando estudiamos cómo se comportaron las concentraciones de nutrientes en el punto secundario analizado en 2003 (Figura I.38) y los comparamos con los encontrados en el punto principal (P1) en el mismo momento, encontramos diferencias importantes en función de que nutriente comparado. Los valores de NID fueron similares, aunque el máximo encontrado en el punto P2 (24 de octubre) fue dos veces superior al encontrado en el punto P1 en esa misma



fecha. Respecto al fósforo total esta similitud desaparece y se observan claras diferencias significativas (t-student apareado $p = 0,008$) siendo la concentración media encontrada en el en el punto P2 cuatro veces superior al presentaba en el punto P1. Esta diferencia observada en el fósforo total, hizo que las diferencias entre ambos puntos en la relación DIN/Ptot también fuera significativa (t-student apareado $p = 0,01$).

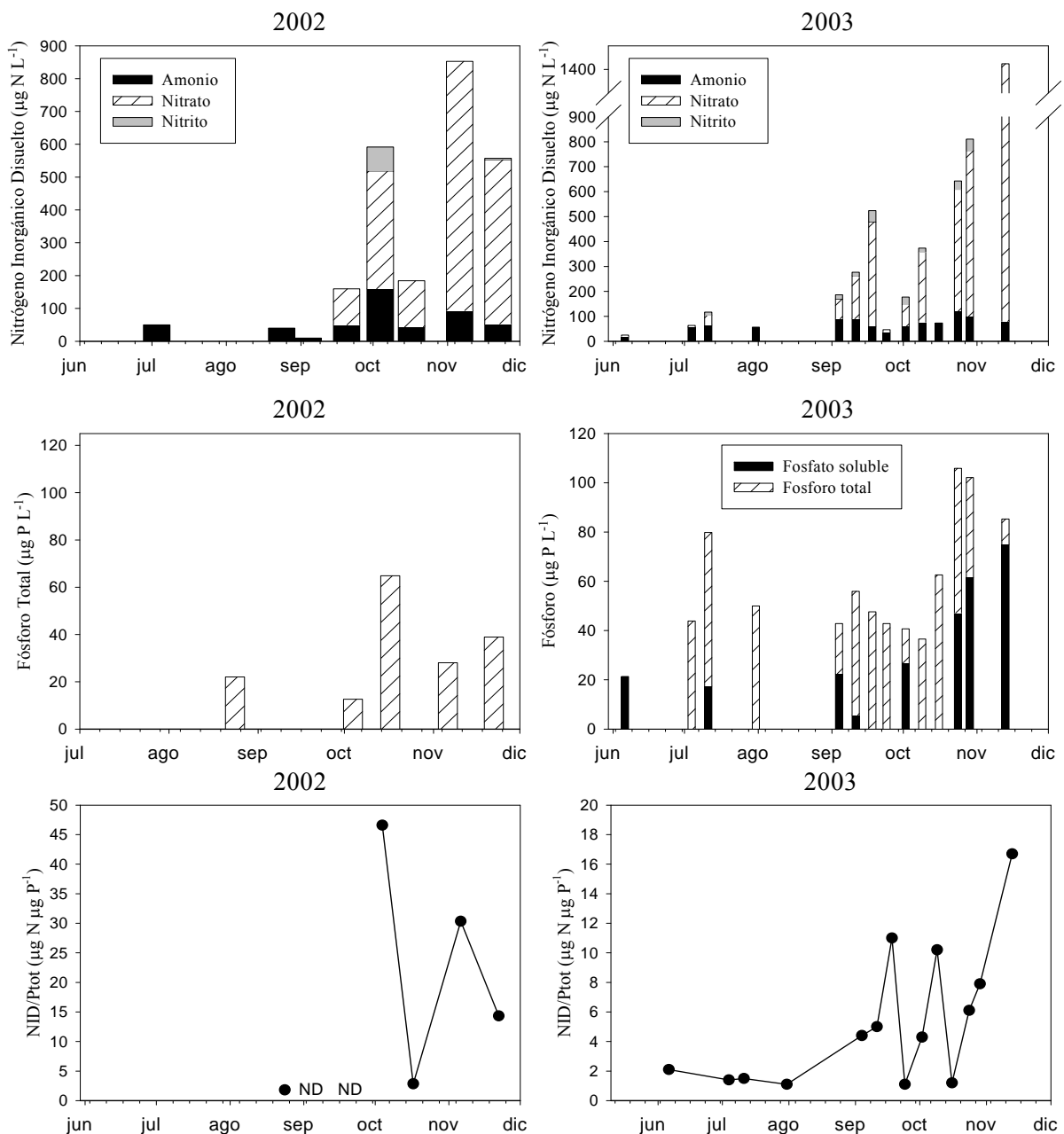


Figura I.37. Concentraciones de nutrientes del punto P1 en el embalse de Picadas. Se muestran las concentraciones de nitrato, nitrito, amonio, fósforo total y relación NID/Ptot para el año 2002 y 2003 y de fosfato soluble para el año 2003. ND = no determinada

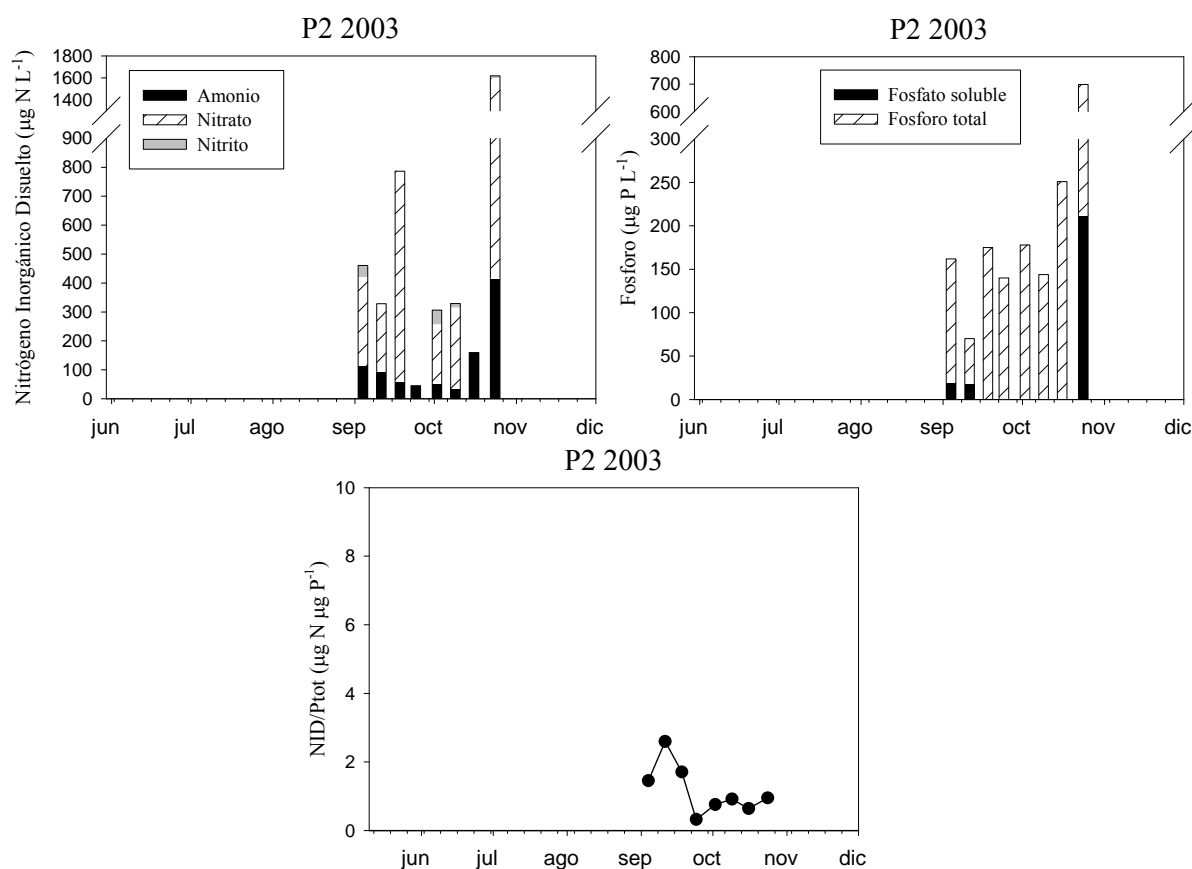


Figura I.38. Concentraciones de nutrientes del punto P2 en el embalse de Picadas. Se muestran las concentraciones de nitrato, nitrito, amonio, fósforo total y relación NID/Ptot y de fosfato soluble para el año 2003.

4.7.2. Variables físico-químicas.

Los valores encontrados, como en el punto SJ del embalse de San Juan, fueron muy similares en el punto P1 en los dos años muestreados (Figura I.39). La temperatura alcanzó valores máximos superiores a 24 °C en el mes de agosto, para a partir de ese momento disminuir hasta valores inferiores a 15 °C en el mes de noviembre en el año 2002 y ligeramente superiores en el 2003. La turbidez fue la única variable que presentó diferencias entre los dos años, encontrándose en general valores superiores en el año 2003 que en el 2002, diferencias que fueron significativas (t-student $p = 0,049$). Mientras que tanto el pH como el oxígeno disuelto y la conductividad mostraron valores y patrones similares cuando comparamos los dos años.

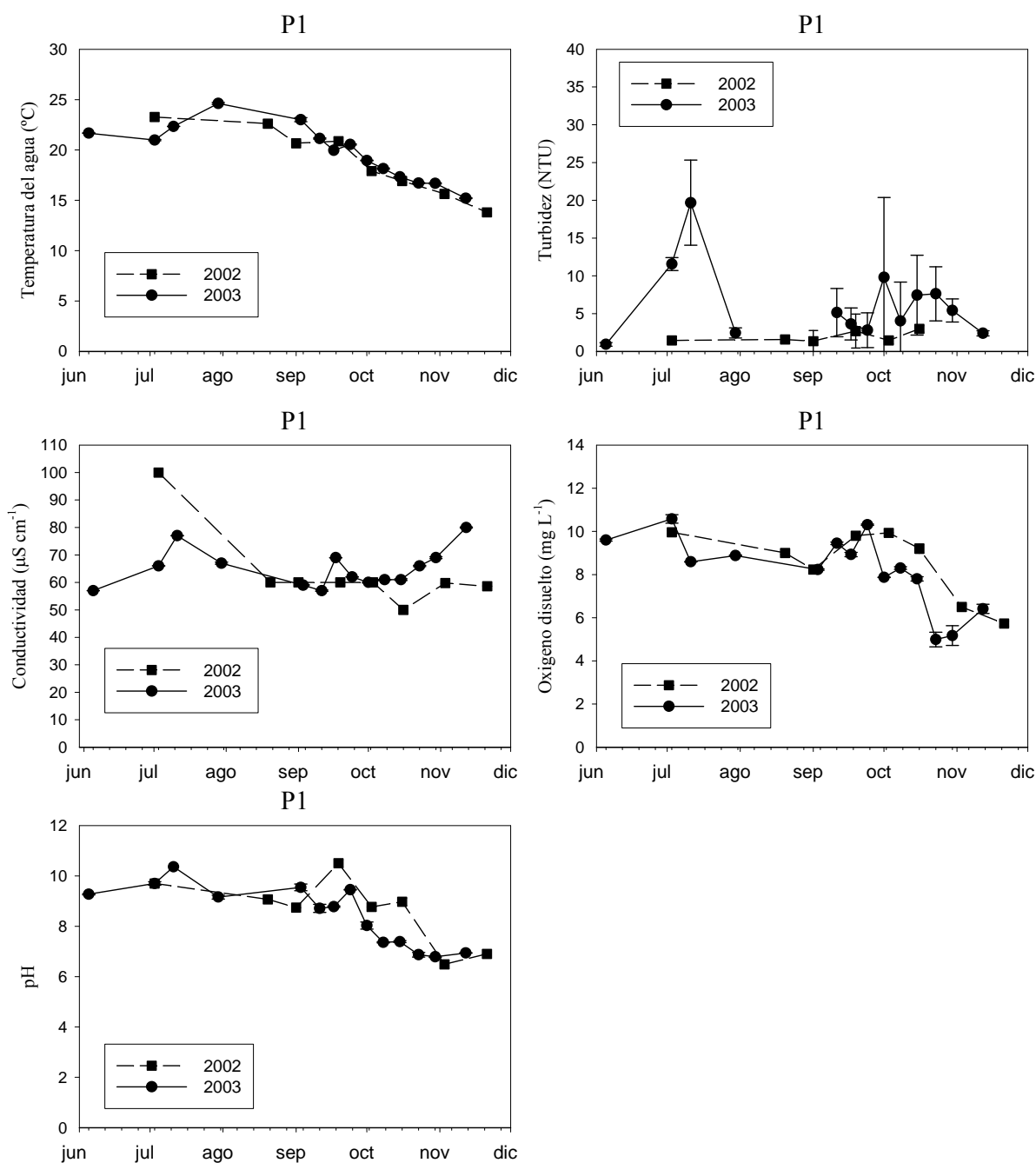


Figura I.39. Variables físico-químicas analizadas en el punto P1 del embalse de Picadas. Se muestran la temperatura del agua, turbidez, conductividad, oxígeno disuelto y pH para el año 2002 y 2003.

Respecto a cómo se comportaron los diferentes puntos de muestreo analizados en el año 2003 (Figuras I.39 y I.40) las variables temperatura, oxígeno disuelto y pH fueron muy



similares no encontrándose diferencias significativas. En el caso del la turbidez si existen valores superiores en el punto P2 respecto al punto P1, pero la gran variabilidad que este valor presenta, hace que las diferencias observadas no sean significativas. Finalmente la conductividad si mostró valores ligeramente superiores en el punto P1, que el punto P2, siendo significativas las diferencias observadas (test de Wilcoxon $p = 0,023$).

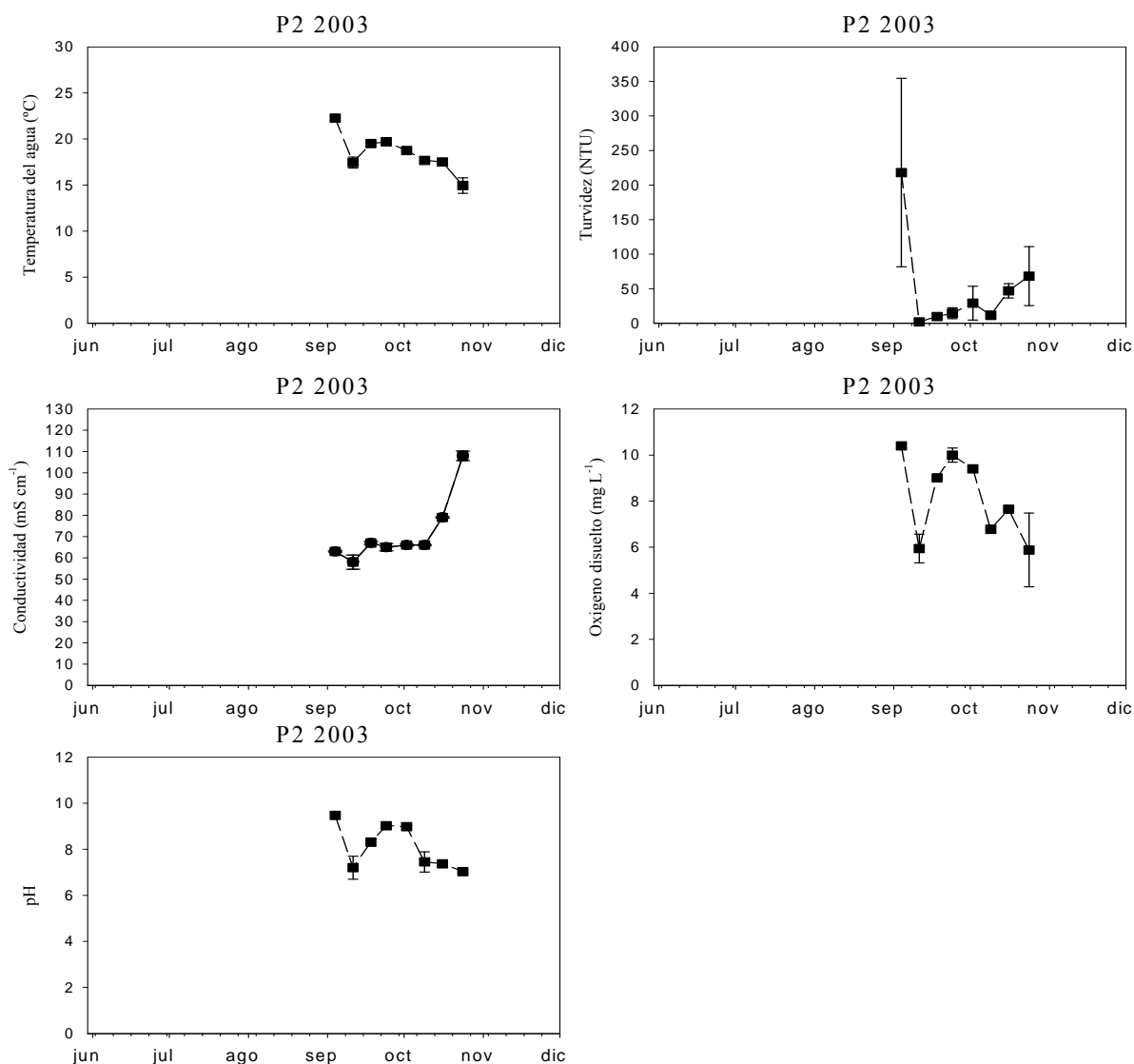


Figura I.40. Concentraciones de nutrientes del punto P2 en el embalse de Picadas.

Se muestran las concentraciones de nitrato, nitrito, amonio, fósforo total y relación NID/Ptot y de fosfato soluble para el año 2003.



4.7.3. Clorofila *a* y fitoplancton.

El embalse de Picadas ha presentado una gran diversidad en cuanto a los valores de clorofila *a* encontrados, especialmente entre los valores encontrados en los dos puntos muestreados en el año 2003. El punto P1 que fue analizado en ambos años, mostró concentraciones de clorofila *a* inferiores a $40 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$ (Figura I.41), con una media de; $14,4 \pm 11,9 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$ en el año 2002 y $12,0 \pm 5,8 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$ en el año 2003, siendo el máximo alcanzado en el 2002 ($38,3 \pm 6,6 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$) ligeramente superior al encontrado en el año siguiente ($20,4 \pm 0,5 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$). Los patrones de aparición de la clorofila *a* también fueron ligeramente diferentes encontrado la máxima concentración en el 2002 en el mes de octubre, mientras que en el año 2003, se observa dos picos máximos uno en el mes de julio y otro en el mes de septiembre.

Analizando la importancia de los diferentes grupos algales encontramos que las cianobacterias fueron el grupo algal que presentó una mayor importancia en este embalse, destacando el año 2003 durante en cual este grupo representó como media el $72\% \pm 19\%$ de la clorofila *a* total, dominando la población en casi todas las fechas salvo en la última en el mes de noviembre y alcanzando los valores máximos en porcentaje cuando los valores totales de clorofila *a* eran máximos.

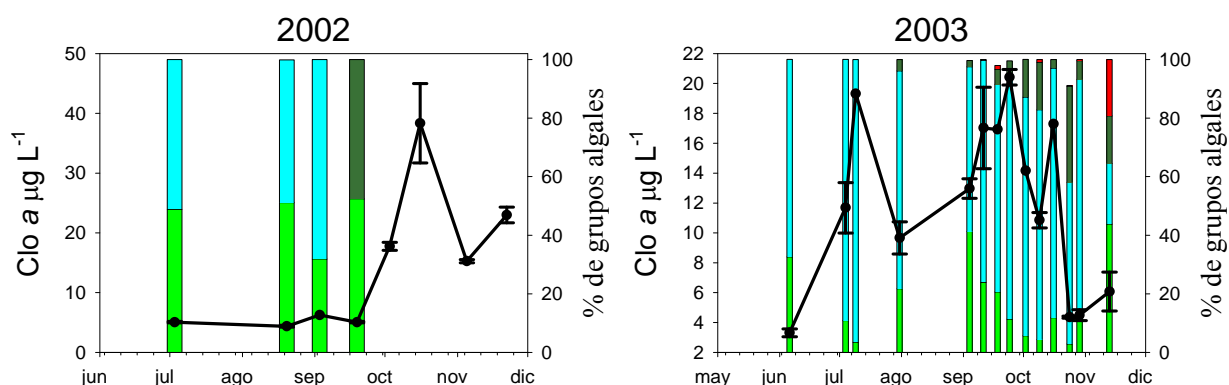


Figura I.41. Concentraciones de clorofila *a* y porcentaje de grupos algales en el punto P1 del embalse de Picadas. Se muestran las concentraciones de clorofila *a* determinadas mediante extracción metanólica (línea continua) y % de esa clorofila *a* (barras) que pertenece a cada uno de los cuatro grupos algales (algas verdes (verde), cianobacterias (azul), diatomeas (marrón) y criptofitas (rojo) determinada por métodos fluorométricos.

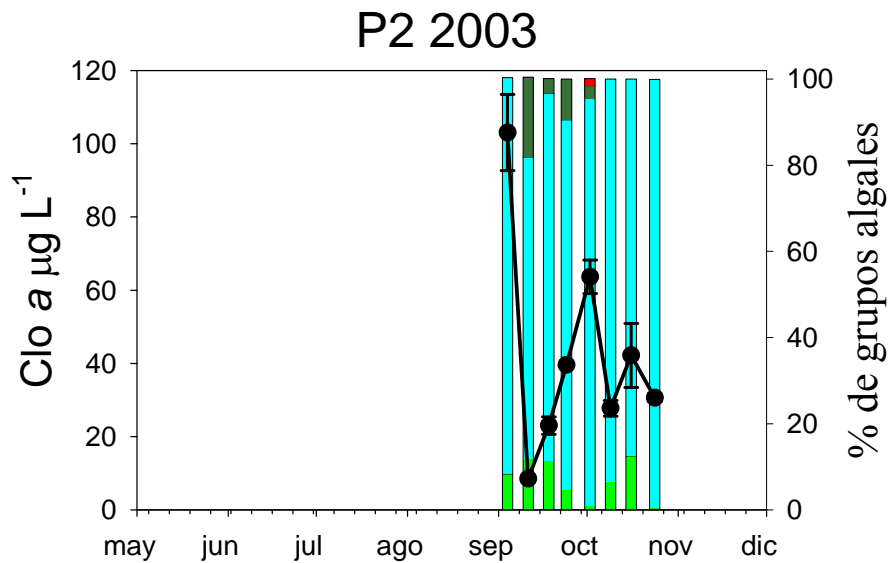


Figura I.42. Concentraciones de clorofila *a* y porcentaje de grupos algales en el punto P2 del embalse de Picadas en el año 2003. Se muestran las concentraciones de clorofila *a* determinadas mediante extracción metanólica (línea continua) y % de esa clorofila *a* (barras) que pertenece a cada uno de los cuatro grupos algales (algas verdes (verde), cianobacterias (azul), diatomeas (marrón) y criptofitas (rojo) determinada por métodos fluorométricos.

El punto P2 presentó concentraciones de clorofila *a* mucho mayores a las encontradas en el punto P1 en el mismo momento (Figura I.42 y Figura I.41) alcanzando un valor máximo superior a $100 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$ y un valor medio durante el periodo analizado $42,3 \pm 29,3 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$, valor casi 4 veces superior al encontrado en ese mismo periodo en el punto P1 ($14,2 \pm 5 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$) existiendo diferencias significativas entre los dos puntos analizados (t-student apareado $p = 0,032$). Respecto a que porcentaje de esta clorofila *a* pertenecía a cianobacterias las diferencias fueron menores encontrando valores ligeramente superiores en el punto P2 ($88\% \pm 9\%$), que el punto P1 ($73\% \pm 11\%$) aunque también las diferencias observadas fueron significativas (t-student apareado $p = 0,037$)



Después de comprobar que las cianobacterias fueron elementos importantes de la población fitoplancton queda por analizar cuales fueron las especies de cianobacterias que estuvieron presentes (Figura I.43). En total en los dos años pudieron detectarse siete especies diferentes, de esas cinco estuvieron presentes en los dos años: *M. aeruginosa* y *M. flos-aquae*, *A. flos-aquae*, *A. crassa* y *Aph. flos-aquae*. Además, encontramos una especie de *Anabaena* que no fuimos capaces de identificar en el año 2002 y *A. planktonica* en 2003.

Durante el año 2002 es difícil identificar ninguna especie que podamos considerar dominante durante el periodo objeto de estudio: *M. aeruginosa* dominó en tres ocasiones, *Aph. flos-aquae* dominó en otras dos y finalmente *A. flos-aquae* dominó en una. Esto significa que ninguna especie dominó en más del 38% de los muestreos realizados. *M. aeruginosa* fue importante sobre todo en agosto y septiembre, *Aph. flos-aquae* en el mes de octubre y *A. flos-aquae* en el primer muestreo en el mes de julio.

En el año 2003 sí podemos identificar una especie claramente dominante, *M. aeruginosa* que dominó la población en 8 ocasiones (67% de las fechas analizadas), especialmente durante los meses de septiembre y octubre cuando se presentó el segundo pico de clorofila *a*. En el resto de ocasiones las especies más importantes fueron *A. flos-aquae* que dominó en la primera parte del periodo de muestreo y estuvo presente durante el resto de muestreos, y *Aph. flos-aquae* que dominó en cuando se produjo la sucesión entre las dos especies mayoritarias. De las otras tres especies detectadas sólo una de ellas *M. flos-aquae* presentó importancia relativa en el último muestreo realizado donde fue la segunda especie detrás de *M. aeruginosa*.

Las especies de cianobacterias presentes en ambos puntos de muestreo (Figura II.43 y II.44) fueron las mismas: *M. aeruginosa*, *M. flos-aquae*, *Aph. flos-aquae* y *A. flos-aquae*. En cuanto a los valores de abundancia que presentaron, estos fueron prácticamente idénticos en los puntos en la misma fecha, siendo *M. aeruginosa* la especie dominante en todos los muestreos salvo en el primero.

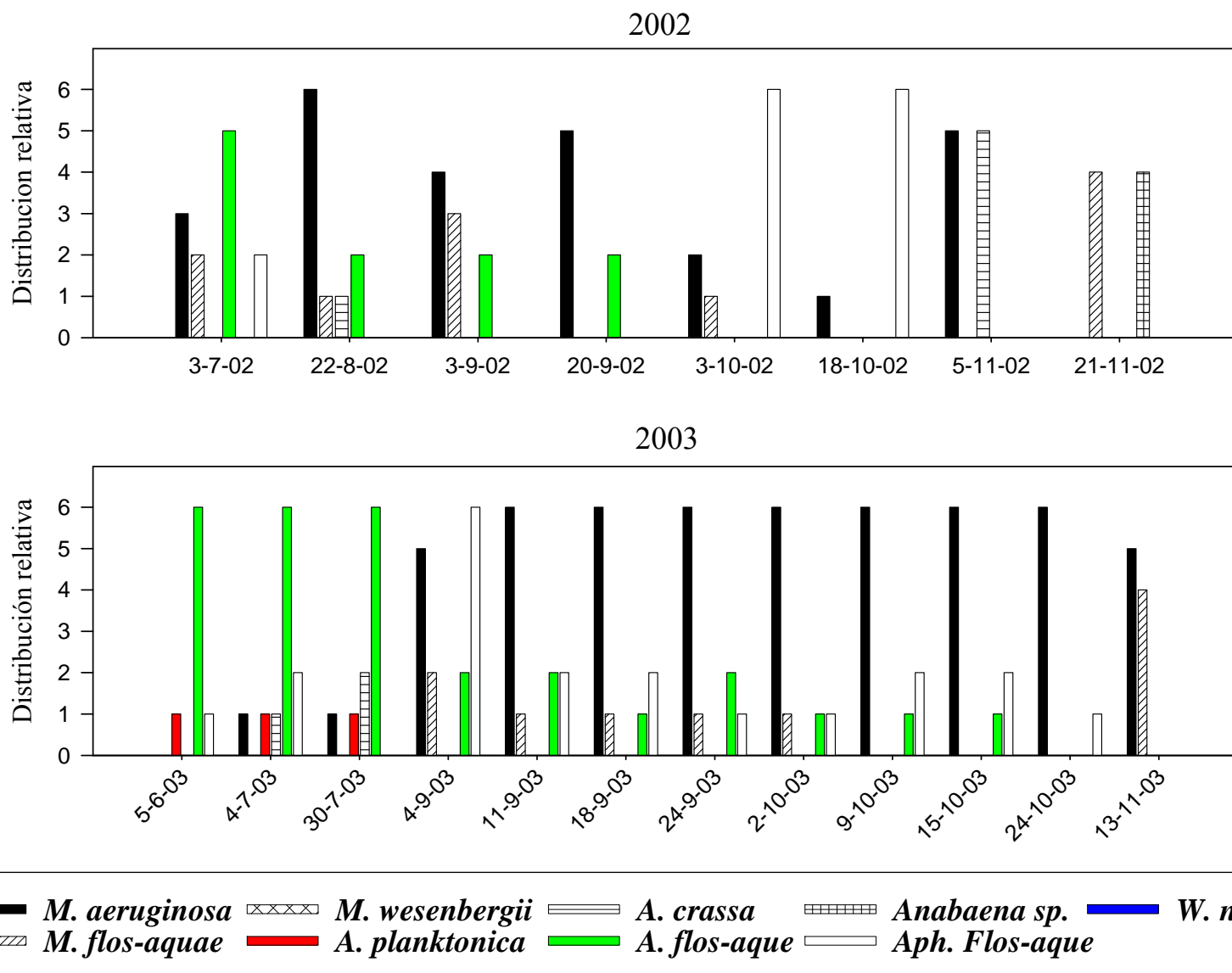


Figura I.43. Distribución relativa de cianobacterias planctónicas presentes en el punto P1 del embalse de Picadas.

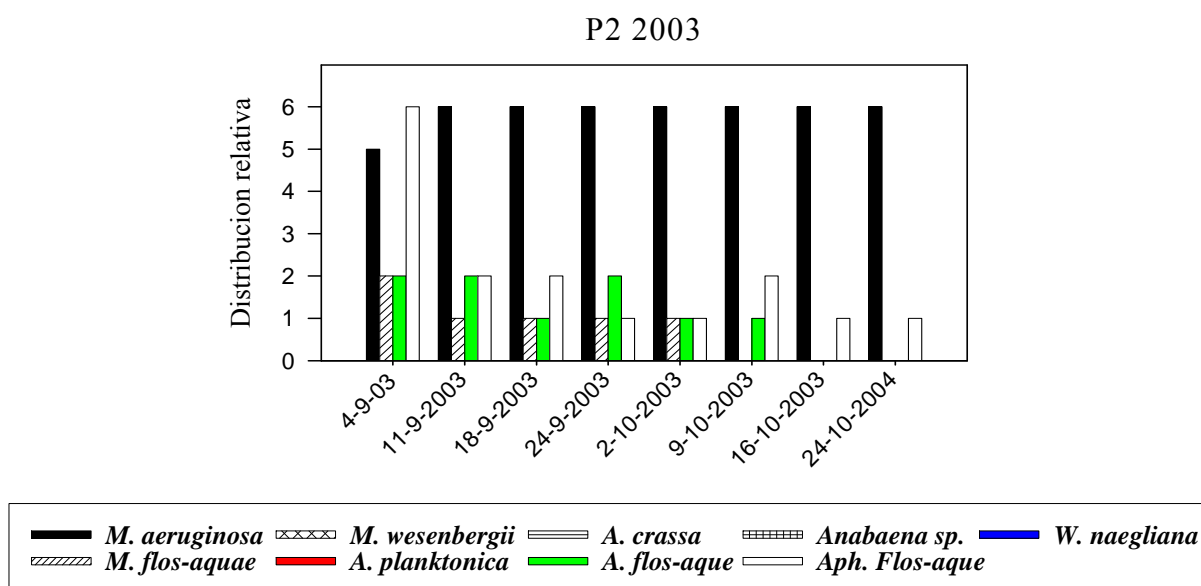


Figura I.44. Distribución relativa de cianobacterias planctónicas presentes en el punto V2 en el año 2003.

4.8. Relaciones de clorofila *a* total y clorofila *a* de cianobacterias con los factores ambientales analizados.

La clorofila *a* total ha mostrado grandes variaciones, no sólo entre los diferentes embalses analizados sino en un mismo embalse. Vistas estas grandes diferencias entre las concentraciones máximas y mínimas, se ha ver si estas variaciones se correlacionaban con alguna de las variables analizadas y estas variables entre sí. Para ello la clorofila *a* determinada por métodos espectrofotométricos se correlacionó con los factores ambientales, nutrientes, variables físico-químicas y los valores de clorofila *a* obtenidos por medidas fluorométricas (Tabla I.3). Cuando analizamos las correlaciones cruzadas entre las diferentes variables, la correlación más fuerte observada, como cabía esperar, se encuentra entre los valores de clorofila *a* determinada mediante el técnicas espectrofotométricas y fluorométricas, puesto que en principio es el mismo parámetro medido por técnicas diferentes. Otras correlaciones que cabe la pena destacar fueron las que se observan entre las concentraciones de clorofila *a* pertenecientes a cianobacterias y algas verdes y la clorofila *a* total. En cuanto a como se correlacionan los dos grupos algales mayoritarios en los embalses de la Comunidad de Madrid, las algas verdes y las cianobacterias entre si, podemos observar que las concentraciones de clorofila *a* de cada uno de estos grupos no mostraron correlación, pero si cuando lo que comparamos son los porcentajes de cada uno de estos grupos, siendo la correlación altamente



significativa y negativa (-0,7). Los otros dos grandes grupos que restan, las criptofitas y las diatomeas, fueron excluidos del análisis por presentar una importancia marginal en los embalses analizados. Estos grupos también se correlacionaron cuando comparamos las concentraciones de clorofila *a* de cada grupo con las clorofila *a* total la Figura I.45 nos permite observar con más en detalle como se correlacionan, en ella podemos observar que cuando se alcanzaron las concentraciones máximas de clorofila *a* (por encima de $50 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$) es la clorofila *a* perteneciente a las cianobacterias la que mejor se ajusta a la clorofila *a* total, mientras que las concentraciones de clorofila *a* perteneciente a algas verdes no superó en ningún caso los $50 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$.

En cuanto a los nutrientes y su correlación tanto con la clorofila *a* total y la clorofila *a* de los diferentes grupos algales, cabe destacar que únicamente presentaron una fuerte correlación positiva con el fósforo total. Respecto al resto de los factores ambientales observamos que la clorofila *a* total se correlacionó de manera positiva con el pH, con el oxígeno y con la turbidez, las cuales parecen ser causas de la biomasa algal más que consecuencias de la misma. En el caso de los diferentes grupos algales y sus correlaciones con los nutrientes, la clorofila *a* de algas verdes se correlacionó especialmente con el fósforo total y de manera mucho más débil con la turbidez, el NID y el pH. Las cianobacterias, se correlacionaron de manera especial con fósforo total, el pH y de manera mucho más débil con el nitrato, el oxígeno disuelto. Cabe destacar que aunque sea con un valor de correlación Pearson muy bajo las cianobacterias se correlacionaron de manera negativa con la relación NID/Ptot. Cuando analizamos como se comportaron estos factores respecto a los porcentajes de cada grupo algal encontramos efectos contrarios sobre los dos grandes grupos por parte de la conductividad que parece favorecer muy ligeramente a al porcentaje de algas verdes y mientras que el pH se correlaciona positivamente con el porcentaje de cianobacterias, aunque los valores de correlación de Pearson fueron muy bajos en todos los casos. Finalmente, en esta tabla podemos observar las correlaciones entre los diferentes nutrientes, eliminando aquellos que presentan una fuerte autocorrelación, al estar incluidos en otro factor (p.e el nitrato y el amonio en el DIN, o el Ptot en la relación NID/Ptot), observamos como cabía esperar que tanto el NID y sus componentes se correlacionan negativamente con la temperatura, también podemos destacar que el pH se correlacionó fuertemente con el fósforo total y que la turbidez se correlacionó de manera negativa con el NID y sus componentes, y positivamente con la temperatura y el oxígeno disuelto.



Resultados

	<i>Clo a esp.</i>	<i>Clo a Flu.</i>	<i>Clo a Gr.</i>	<i>Clo a Ci.</i>	% Gr.	% Ci.	Amonio	Nitrato	NID	Ptot	NID/Ptot	Temp.	Cond.	O ₂ dis.	pH	Turb.
<i>Clo a esp.</i>		0,830(**)	0,719(**)	0,419(**)	-0,020	0,054	0,034	0,056	0,071	0,634(**)	-0,134	-0,043	0,086	0,294(**)	0,477(**)	0,258(**)
<i>Clo a Flu.</i>			0,847(**)	0,456(**)	-0,084	0,037	0,163(*)	0,166(*)	0,158(*)	0,720(**)	-0,155	-0,099	0,029	0,193(*)	0,528(**)	0,173(*)
<i>Clo a Gr.</i>				-0,052	0,253(**)	-0,282(**)	0,084	0,054	0,159(*)	0,570(**)	-0,086	0,037	0,155	0,106	0,195(*)	0,263(**)
<i>Clo a Ci.</i>					-0,398(**)	0,533(**)	0,111	0,176(*)	-0,040	0,414(**)	-0,193(*)	-0,059	-0,028	0,207(*)	0,446(**)	0,112
% Gr.						-0,687(**)	0,058	-0,029	0,059	-0,035	0,049	0,162(*)	0,243(**)	0,053	-0,226(**)	0,119
% Ci.							-0,171(*)	-0,116	-0,250(**)	0,026	-0,160	0,079	-0,159(*)	0,110	0,258(**)	0,119
Amonio								0,339(**)	0,524(**)	0,309(**)	0,165(*)	-0,557(**)	0,125	-0,273(**)	0,241(**)	-0,497(**)
Nitrato									0,909(**)	0,208(**)	0,531(**)	-0,612(**)	0,017	-0,158(*)	-0,005	-0,468(**)
NID										0,199(**)	0,549(**)	-0,672(**)	0,062	-0,201(**)	0,061	-0,547(**)
Ptot											-0,268(**)	-0,154(*)	0,348(**)	-0,068	0,627(**)	-0,003
NID/Ptot												-0,405(**)	-0,162(*)	-0,087	-0,128	-0,324(**)
Temp.													-0,034	0,179(*)	-0,144	0,665(**)
Cond.														-0,072	-0,001	0,043
O ₂ dis.															0,046	0,537(**)
pH																0,034
Turb.																

Tabla I.3: Correlaciones entre las variables analizadas. Para más información ver página siguiente

**Tabla I.3. Correlaciones entre las variables analizadas (pagina anterior):**

Correlación de Pearson entre los factores analizados. Se muestra el valor de coeficiente de Pearson, en negrita los valores significativos (* = $p < 0,05$, ** = $p \leq 0,01$). Clo a esp. = clorofila *a* calculada por medios espectrofotométricos, Clo a Flu. = clorofila *a* calculada fluorométricamente. Gr. = algas verdes. Ci. = cianobacterias. NID = nitrógeno inorgánico disuelto. Ptot = fósforo total. Temp. = Temperatura. Cond. = conductividad. O2 dis. = oxígeno disuelto. Turb. = turbidez.

Respecto a los como afectan el fosfato soluble y la relación NID/Psol al resto de las variables y como únicamente se disponían de datos para el año 2003, se realizó el mismo que el realizado anteriormente pero sólo para este año. En el mismo se pudo observar que la relación NID/Psol sólo se correlacionaba con los dos variables de los cuales deriva el fósforo soluble y con el NID. Mientras que las correlaciones positivas del fosfato soluble pueden verse en la tabla I.4.

Especie	Correlación de Pearson
Amonio	0,519(**)
Nitrato	0,287(**)
Nitrito	-0,022
NID	0,344(**)
Fosforo total	0,256(**)
NID/Psol	-0,311(**)
NID/Ptot	0,168
Temperatura	-0,238(*)
Conductividad	0,150
Oxígeno	-0,467(**)
Turbidez	-0,057
pH	-0,370(**)

Tabla I.4. Correlaciones del fosfato soluble con el resto variables químicas y quimico-físicas analizadas: Correlación de Pearson entre los factores analizados. Se muestra el valor de coeficiente de Pearson, en negrita los valores significativos (* = $p < 0,05$, ** = $p \leq 0,01$). NID = Nitrógeno inorgánico disuelto, Psol = Fosfato soluble, Ptot = Fosforo total.



Finalmente se intentó establecer un modelo matemático que nos permitiera definir la concentración de clorofila *a* en función de las variables físico-químicas y nutrientes. En el proceso de construcción del modelo únicamente quedaron incluidas 4 de las variables introducidas, estas fueron: el fósforo total, turbidez, pH y concentración de oxígeno, siendo las mismas variables independientemente del proceso de modelización utilizado: el Backward Stepwise Regresión o el Forward stepwise Regresion, y en ningún caso explicaron mas del 20% de la varianza por lo que no fue posible desarrollar un modelo adecuado.

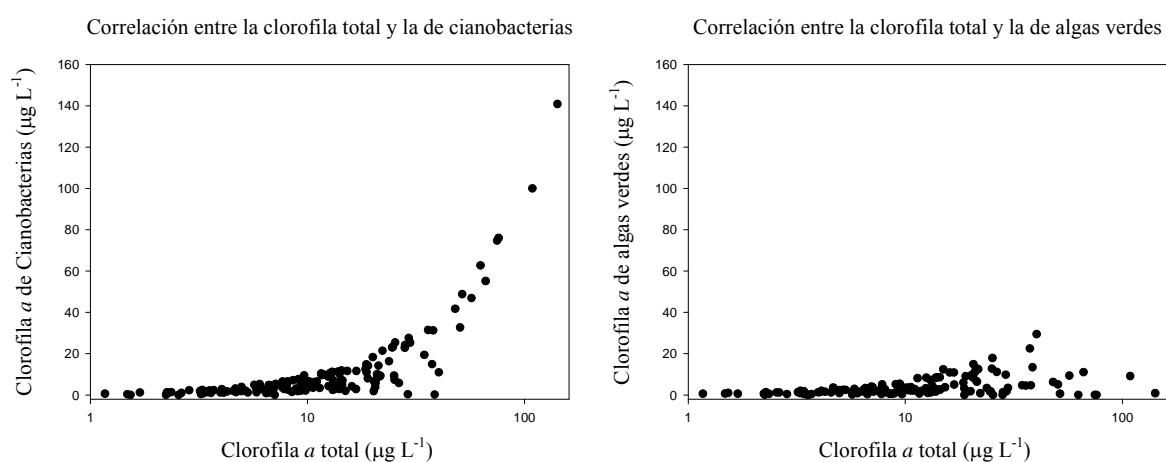


Figura I.45. Correlaciones entre la clorofila *a* total y la clorofila *a* pertenecientes a algas verdes y cianobacterias. Los datos pertenecen a medidas realizadas por métodos fluorométricos.

4.9. Especies de cianobacterias presentes en la Comunidad de Madrid.

En total se han identificado 8 especies de cianobacterias planctónicas diferentes en los embalses estudiados (Figura I.46). Pero no todas ellas fueron igualmente importantes en la Comunidad de Madrid, para analizar este hecho, y debido a que los embalses se muestrearon en un numero diferente de ocasiones, se decidió intentar en la medida de lo posible evitar el sesgo que podría sufrir el análisis si se ponían los datos obtenidos en todos los embalses, puesto que los embalses en los que las cianobacterias potencialmente tóxicas presentaron una mayor importancia fueron muestreados en un mayor número de ocasiones, y si se utilizaran todos los datos estos tendría una mayor importancia en el estudio. Para ello se realizó una



selección de las muestras, éste consistió en que solamente se consideró el punto principal de cada embalse y sólo se utilizaron los muestreos para las fechas para los cuales se tenían datos de al menos 6 embalses. Una vez considerados estos condicionantes se redujo el número total de muestras de 177 a 122.

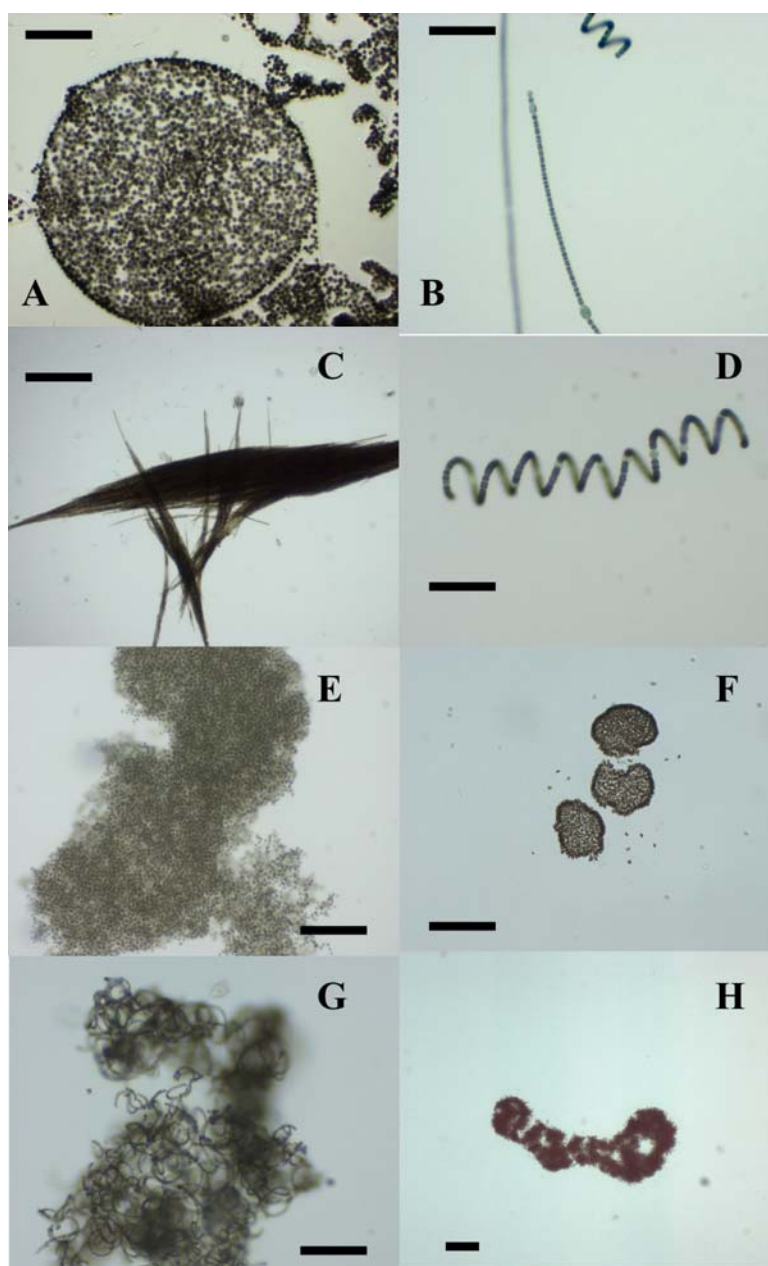


Figura I.46: Cianobacterias identificadas a nivel de especie en los embalses analizados. A = *M. wesenbergii*, B = *A. planktonica*, C = *Aph. flos-aquae*, D = *A. crassa*, E = *M. flos-aquae*, F = *W. naegeliana*, G = *A. flos-aquae*, H = *M. aeruginosa*, La barra negra corresponde a 100 μ m



Un primer factor a analizar fue si existían diferencias en la abundancia que cada una de las especies presentaba entre los años 2002 y 2003, el análisis estadístico mostró que no existían diferencias (test Mann-Whitney en rangos) (datos no mostrados) por lo que para aumentar la potencia del análisis estadístico para el resto de estudios se consideraron los datos de los dos años juntos. Posteriormente analizamos el porcentaje de muestras en las que aparecía cada una de las especies (Tabla I.5), lo que nos permite definir dos grandes grupos de cianobacterias, las cianobacterias que presentan frecuencias medias totales superiores al 50% de las muestras y que pueden considerarse comunes y las que se encuentran por debajo de ese valor consideradas poco abundantes. Curiosamente puede observarse un salto en el porcentaje de aparición que presentan las especies, las especies consideradas poco abundantes no presentaron en ningún caso valores superiores al 33%. Además estas especies raras presentan en general un patrón de aparición contrario a las consideradas comunes siendo más frecuentes en el año 2002, que en 2003. La única especie dentro de las raras que no presentó este patrón inverso fue precisamente la que presentó un valor de frecuencia más elevada *A. planktonica*, que en este aspecto se comportó como las especies consideradas comunes. En total son cuatro especies encontradas que pueden considerarse comunes, dentro de las cuales aparece una clara gradación en cuanto su presencia. *M. aeruginosa* fue la más común estando presente en el 80%, de los muestreos, luego aparece otro grupo que engloba a las especies *Aph. flos-aquae* y *M. flos-aquae* que estuvieron presentes en alrededor del 60% de las muestras y finalmente *A. flos-aquae* que es la última de las especies comunes y se encontró en un 50% de las ocasiones. En el otro extremo entre las cianobacterias menos comunes nos encontramos *M. wesenbergii*, *W. naegeliana* y las *Anabena spp.*, que estuvieron presentes en alrededor del 10% de los muestreos y que en general limitaron su presencia a los embalse de Lozoya y Río Sequillo.

Tan o más importante que la presencia o ausencia de las diferentes especies de cianobacterias es cual fue la abundancia relativa, que cada una de las especies presentó. La metodología semicuantitativa utilizada dificulta la presentación de los datos (una clasificación en rangos de presencia, sin que los rangos fueran homogéneos. Para más información ver materiales y métodos). Por esta razón se decidió mostrar los datos característicos que permiten comparar la estructura que muestran las frecuencias para cada una de las especies (Tabla I.6).



Primero analizamos si existían diferencias en la abundancia que las especies presentaba entre los dos años, este estudio mostró que únicamente dos especies se comportaron de manera diferente entre los dos años, estas especies fueron: *M. aeruginosa* (test Mann-Whitney, $p = 0,029$) y *A. flos-aquae* (test Mann-Whitney, $p = 0,05$) (datos no mostrados). En los dos casos la abundancia fue superior en el año 2003 que en el 2002 a pesar de esta diferencia se decidió agrupar los datos de los dos años para realizar el resto del análisis. La tabla I.6 nos permite identificar una especie claramente más importante que el resto: *M. aeruginosa* presentó valores de abundancia por encima del resto en abundancia relativa al resto de las especies, encontrándose en valores superiores de abundancia. La mediana que presenta esta especie es 4, lo que implica que en el 50% de las muestras esta especie representó más del 26% de las cianobacterias presentes. Es más, estudiando el percentil 75 observamos que como poco en el 25 % de las muestras representó más del 50% de las cianobacterias presentes. Las siguientes especies en orden de importancia fueron: *Aph. flos-aquae*, *M. flos-aquae* y *A. flos-aquae*. El resto de las especies presentaron frecuencias de aparición bajas, como hemos podido ver en la Tabla I.5 y por lo tanto los valores mostrados en esta tabla están muy sesgados por el gran número de muestras en los cuales no pudo observarse su presencia, lo que dificulta su comparación. Las diferencias encontrados entre ellos significativas (análisis Kruskal-Wallis $p \leq 0,001$). Un análisis posterior que permitía analizar todas las comparaciones múltiples y que nos permitiera identificar cuales de los grupos se diferenciaban, lo que se realizó mediante un análisis de Tukey (Tabla I.7). Los resultados muestran que las abundancias de *M. aeruginosa* fueron significativamente diferentes al del resto de las especies, lo que confirma que fue la especie más abundante en los embalses analizados. Después podemos definir otro grupo formado por *M. flos-aquae* y *Aph. flos-aquae* y *A. flos-aquae* que no presentan diferencias entre ellos, pero si con el resto de organismos minoritarios, y un tercer y último grupo formado por el resto de especies identificadas. Así finalmente encontramos que existen tres grandes grupos en cuanto a su importancia, uno que incluiría a *M. aeruginosa*, la cianobacteria más abundante, otro que incluiría las cianobacterias con una abundancia media (*M. flos-aquae* y *Aph. flos-aquae* y *A. flos-aquae*) y finalmente las cianobacterias que pueden considerarse raras, el resto.



Especie	% de aparición 2002	% de aparición 2003	Media
<i>M. aeruginosa</i>	78,6	83,6	80,3
<i>M. flos-aquae</i>	55,7	60,7	59,1
<i>M. wesenbergii</i>	20,0	4,9	13,9
<i>W. naegeliana</i>	18,6	11,5	16,4
<i>A. flos-aquae</i>	46,7	55,7	51,1
<i>A. crassa</i>	27,1	24,6	26,2
<i>A. planctonica</i>	25,7	32,8	28,6
<i>A. spp</i>	10	1,6	6,5
<i>Aph. flos-aquae</i>	60,0	75,4	67,2

Tabla I.5. Frecuencia de aparición de las especies cianobacterianas en los embalses analizados. Para calcular estos valores se consideraron los muestreos para lo que se tenían datos para al menos 6 de los embalses analizados y se consideró únicamente el punto principal. Siendo el % sobre el total de las muestras utilizadas que cumplieron estas condiciones (n = 122).

Especie	Rango	Mediana	25% / 75%
<i>M. aeruginosa</i>	0-6	4	1 / 5
<i>M. flos-aquae</i>	0-6	1	0 / 2
<i>M. wesenbergii</i>	0-6	0	0 / 0
<i>W. naegeliana</i>	0-6	0	0 / 0
<i>A. flos-aquae</i>	0-6	1	0 / 2
<i>A. crassa</i>	0-6	0	0 / 1
<i>A. planctonica</i>	0-5	0	0 / 1
<i>A. spp.</i>	0-4	0	0 / 0
<i>Aph. flos-aquae</i>	0-6	2	0 / 3

Tabla I.6. Frecuencias de aparición de las diferentes especies cianobacterianas encontradas en los embalses de la Comunidad de Madrid. Las muestras utilizadas para realizar este cálculo fueron aquellas en las cuales se tenían datos para al menos 6 de los embalses analizados y solamente en el punto principal. Se muestran, el rango, la mediana, el valor que presenta el valor que hace el 25% de las muestras y el 75%



	<i>M. aeruginosa</i>	<i>M. flos-aquae</i>	<i>M. wesenbergii</i>	<i>W. naegeliana</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>A. crassa</i>	<i>A. planctonica</i>	<i>A. sps.</i>	<i>Aph. flos-aquae</i>
<i>M. aeruginosa</i>		Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
<i>M. flos-aquae</i>			Si	Si	No	Si	Si	Si	No
<i>M. wesenbergii</i>				No	Si	No	No	No	Si
<i>W. naegeliana</i>					Si	No	No	No	Si
<i>A. flos-aquae</i>						Si	Si	Si	Si
<i>A. crassa</i>							No	No	Si
<i>A. planctonica</i>								No	Si
<i>A. sps.</i>									Si
<i>Aph. flos-aquae</i>									

Tabla I.7. Diferencias entre la abundancia de las especies de cianobacterias planctónicas encontradas en los embalses analizados. Las muestras utilizadas para realizar este cálculo fueron aquellas en las cuales se tenían datos para al menos 6 de los embalses analizados y sólo en el punto principal. Si, corresponde con los grupos que mostraron diferencias significativas (test de Tukey, $p < 0,05$).



Todo el análisis anterior muestra que uno de los factores fundamentales que diferencia a las especies es el número de muestras en las cuales no es posible detectar una muestra y por lo tanto presenta un valor de abundancia de 0. Este hecho dificulta encontrar diferencias entre las especies raras, puesto que la comparación se basa en el establecimiento de percentiles, lo que nos permite comparar la distribución de las frecuencias observadas. Esto hace que todas las especies raras se agrupen juntas. Por ello, y con el fin de observar si existían diferencias entre ellas, consideramos que si eliminamos los valores iguales a cero y realizamos la comparación de las diferentes especies, esto nos permitirá conocer si las especies minoritarias presentan diferente importancia en la Comunidad de Madrid y además podrían mostrar si una vez que una especie es detectada y por lo tanto las condiciones para que aparezca se dan, existe alguna especie cianobacteriana que dominar sobre el resto, o si todas presentan distribuciones de abundancias similares. Una vez eliminados los valores iguales a 0 (Tabla I.8), podemos ver que la mayor parte de las diferencias que existían entre las diferentes especies desaparecieron. *M. aeruginosa* sigue mostrando valores importantes tanto de mediana, que en este caso alcanza un valor de 5 (lo que indica cuando estuvo presente en un embalse, en el 50% de las muestras representaba el 50% o más de la población). El resto de las especies sin embargo presenta valores muy similares, sin que se observaran diferencias claras entre ellas. Esto se demuestra cuando realizamos el test de Kruskal-Wallis sobre estos datos, este siguió detectando diferencias entre grupos estadísticamente significativas ($p \leq 0,001$), pero cuando analizamos las diferencias las especies (test de Dunn's, datos no mostrados), únicamente se encontraron diferencias significativas entre *M. aeruginosa* y las especies que se encontraron en mas del 25% de las muestras, estas fueron *Aph. flos-aquae*, *M. flos-aquae*, *A. flos-aquae*, *A. crassa* y *A. planctonica*. En el resto de las posibles relaciones entre especies no se encontraron diferencias significativas. Lo que indicaría que en general, salvo para *M. aeruginosa* que parece adaptarse a casi todo el rango ambiental que se presenta en los embalses analizados y además parece dominar en casi todos ellos, el resto una vez aparece en el embalse presenta una importancia en el similar, puesto que suelen presentar valores de abundancia similares.

Otro factor importante de este trabajo fue intentar establecer cuales eran las especies de cianobacterias que se asociaban entre si, lo que indicaría que sus requerimientos ecológicos podrían ser similares, para ello se realizó un estudio de análisis de correspondencias entre



ellas. Para realizar este análisis no se consideraron las cepas del género *Anabaena* de las cuales no se conocía la especie, puesto que en principio podrían ser de múltiples especies y presentar requerimientos ecológicos diferentes. Primero se consideró si la especie estuvo presente o no, sin considerar la abundancia relativa que presentaban, para ello se le construyó una matriz a la que cada especie se le dieron valores de cero (ausente) y uno (presente) (Figura I.47a). En esta gráfica podemos observar que aparecen dos grandes grupos, uno de ellos implica a las tres cianobacterias más abundantes, *M. aeruginosa*, *M. flos-aquae* y *Aph flos-aquae*. El otro gran grupo engloba a dos especies de *Anabaena*, *A. crassa*, *A. planctónica* y también a *W. naegeliana*. En una posición intermedia entre estos dos grupos encontramos a la especie *A. flos-aquae* en una situación intermedia entre los dos grupos. Finalmente la última especie considerada en este análisis *M. wesenbergii*, que se encontró fundamentalmente en el año 2002 en el embalse de El Vellón, aparece alejada del resto. Esto podría indicar que sus requerimientos ecológicos podrían ser diferentes a los que presentaban las otras dos especies de *Microcystis* encontrados en este trabajo. Para ver si las abundancias afectaban a la distribución de las diferentes especies, se realizó otro análisis vectorial en el que se utilizaron los valores de abundancia (Figura I.47b) y no sólo la presencia y ausencia. Sin que los datos variaran de manera significativa.

Especie	Número de muestras	Rango	Mediana	25% / 75%
<i>M. aeruginosa</i>	99	1-6	5	2 / 6
<i>M. flos-aquae</i>	72	1-6	2	1 / 3
<i>M. wesenbergii</i>	18	1-6	2	2 / 6
<i>W. naegeliana</i>	20	1-6	3	2 / 4
<i>A. flos-aquae</i>	60	1-6	2	1 / 4
<i>A. crassa</i>	32	1-6	1	1 / 3
<i>A. planctonica</i>	35	1-5	2	1 / 4
<i>A. sps.</i>	8	1-4	3	2 / 4
<i>Aph. flos-aquae</i>	82	1-6	2	2 / 3

Tabla I.8. Frecuencias de aparición de las diferentes especies cianobacterianas encontradas en los embalses de la Comunidad de Madrid. Las muestras utilizadas para realizar este cálculo fueron aquellas en las cuales se tenían datos para al menos 6 de los embalses analizados y únicamente el punto principal. Se muestran, el rango, la mediana, el valor que presenta el valor que hace el 25% de las muestras y el 75%

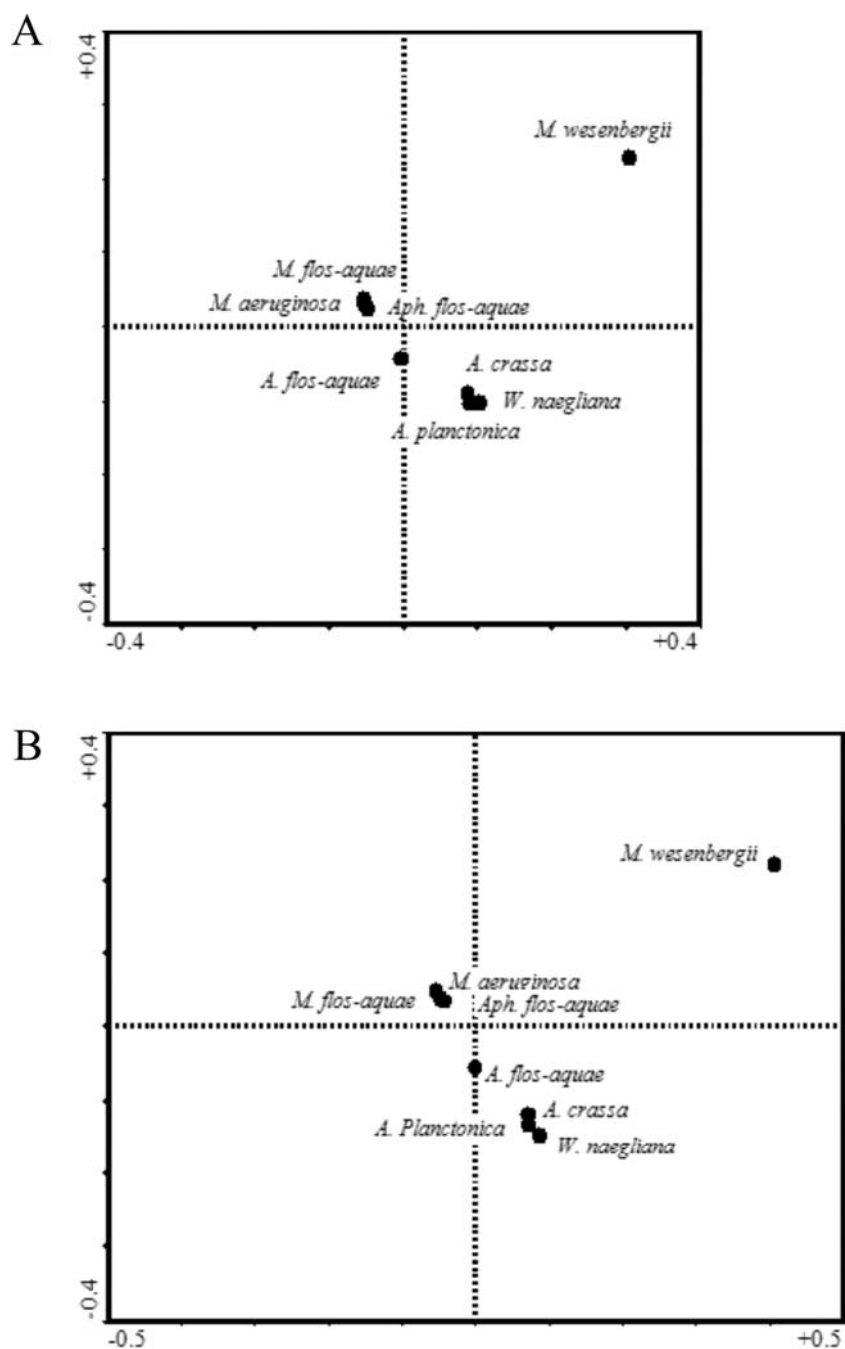


Figura I.47 Análisis de correspondencia: relación de las diferentes especies de cianobacterias. Figura A: relación teniendo en cuenta únicamente la presencia o ausencia de los especies. Figura B: relación teniendo en cuenta la abundancia relativa de las especies. En ambos casos no se consideraron las cepas del género *Anabaena* encontradas que no fueron identificadas a nivel de especie, en ambos casos la varianza explicada fue superior al 70%.



El siguiente paso fue intentar correlacionar la presencia de cada una de las cianobacterias con las variables físico-químicas y ambientales que aparecían, con el fin de saber si era posible establecer cuales eran las condiciones ambientales más adecuadas para las diferentes especies de cianobacterias planctónicas que se han encontrado. Los estudios de análisis canónico de correspondencias entre las variables analizadas y las abundancias relativas de cianobacterias han presentado en todas las posibles variaciones analizadas han explicado menos del 30% de la varianza total, y ninguna de las variables analizadas presentaron relaciones significativas (análisis de permutaciones de Monte Carlo datos no mostrados). Bajo estas condiciones no fue posible identificar cuales fueron las condiciones ideales para cada uno de las especies analizadas.

4.10. Presencia de Afloramientos de cianobacterias en los embalses de la Comunidad de Madrid.

Como hemos visto en la introducción no existe una definición clara de afloramiento, si aceptamos la definición propuesta en la introducción de $10 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$, todos los embalses analizados presentarían afloramientos y en algunos de ellos se extenderían durante todo el periodo de muestreos. Puesto que una de las definiciones más aceptadas de afloramiento es un crecimiento de algas superior al nivel basal del embalse, vamos a intentar establecer un nivel de clorofila *a* único para todos los embalses analizados partir del cual pudiéramos considerar que ha ocurrido un afloramiento. Con el fin de establecer este valor límite se hizo una media de todas las concentraciones de clorofila *a* encontradas en todos los embalses, eliminando aquellas que sobrepasaron los $100 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$, ya que de normalmente estas concentraciones pueden sin duda ser considerados como afloramientos, y sesgarían el valor medio, de esta manera podremos establecer cual es la concentración basal media durante el periodo analizado en los embalses de la Comunidad de Madrid. La media de todos los embalses fue de $22,2 \pm 21,3 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$. Teniendo en cuenta la media y la desviación estándar se decidió establecer la concentración a partir de la cual se consideraría afloramiento, este fue de $50 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$ en dos veces el valor medio determinado para la Comunidad de Madrid.



Una vez definido el valor a partir del consideramos que se ha producido un afloramiento analizamos los datos encontrados en cada uno de los embalses analizados, lo que nos permitiría determinar cual fue el número de afloramientos que han ocurrido durante los dos años analizados y en qué embalses han tenido lugar. También sería de interés determinar cuanto duró el evento, la intensidad del afloramiento y cual fue la especie que dominó. Para las fechas en las cuales se disponía de datos de dos puntos diferentes de una embalse se realizó la media aritmética para definir si existía o no afloramiento y para calcular tanto la clorofila *a* media, como la clorofila *a* máxima, la especie dominante en los dos puntos fue en todos los casos idénticos.

Bajo estas condiciones durante los periodos analizados se han detectado 8 afloramientos en la Comunidad de Madrid. Estos han tenido lugar en cuatro de los siete embalses analizados con concentraciones medias de clorofila *a* en cuatro ocasiones por encima de $90 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$ (Tabla I.9). El embalse de Santillana destaca entre todos los estudiados por haber presentado el mayor número de afloramientos con un total de 4, tres de ellos en el año 2002, en los meses de septiembre y octubre y el restante en el mes de julio del año 2003 y se ha alcanzado la mayor concentración de clorofila *a*. Otro de los embalses estudiados y que también presentó afloramientos en los dos años analizados fue el embalse de Valmayor, en este, observamos un afloramiento en el año 2002 entre los meses de julio y agosto donde las algas verdes fueron alrededor del 50% de la clorofila *a* total encontrada y otro en octubre de 2003 este que solo presentó una duración de una semana, pero que mayoritariamente estuvo dominado por cianobacterias. Finalmente los dos últimos embalses que presentaron afloramientos fueron los de Lozoya y Picadas, presentaron un afloramiento en los meses de septiembre del 2002 y octubre del 2003 respectivamente.

La duración de esos eventos fue en todos los casos menor de 4 semanas y en la mayor parte de los casos se extendieron menos de una semana, que fue la mayor frecuencia de muestreo utilizada en este trabajo, como media, los afloramientos duraron 2 semanas. Finalmente, hay una especie que dominó claramente los afloramientos encontrados, en seis de los ocho afloramientos la especie dominante fue *M. aeruginosa*, en los otros dos fueron especies del orden nostocales las que fueron dominantes.



Cuando comparamos el número de afloramientos que se presentaron en cada año, podemos observar que mientras que en 2002 se detectaron 5 afloramientos (tres de ellos en el embalse de Santillana), en 2003 sólo fueron 3. Las concentraciones medias y máximas encontradas fueron netamente diferentes en ambos años, en todos los casos fueron superiores en el 2002 puesto que todos los afloramientos presentaron concentraciones superiores a las que encontramos en el año 2003. De hecho, todos los afloramientos detectados en el año 2003 estuvieron siempre muy cerca del límite de $50 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$ a partir del cual se consideró que existía un afloramiento. Esta diferencia entre las concentraciones de clorofila *a* se confirmó cuando se compararon las concentraciones de clorofila *a* que se obtuvieron en ambos años, y que fueron significativamente mayores en el año 2002 que en el año 2003 (test Mann-Whitney, $p = 0.012$).

Embalse y año	Duración	Media Clo <i>a</i> ($\mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$)	Clo <i>a</i> Máx. Fecha ($\mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$)	Cianobacteria Dominante
Lozoya 2002	2 semanas	$104,1 \pm 9,1$	110,6 3/9/2002	<i>A. crassa</i>
Santillana 2002	4 semanas	$95,8 \pm 53,6$	178,1 12/9/2002	<i>M. aeruginosa</i>
Santillana 2002	2 semanas	$194,7 \pm 53,6$	232,7 7/10/2002	<i>M. aeruginosa</i>
Santillana 2002	1 semana	138,8	138,9 5/11/2002	<i>M. aeruginosa</i>
Santillana 2003	1 semana	50,9	50,9 9/7/2003	<i>M. aeruginosa</i>
Valmayor 2002	4 semanas	$60,2 \pm 18,7$	79,4 20/8/2002	<i>Aph. flos-aquae</i>
Valmayor 2003	1 semana	52,2	52,3 16/10/2003	<i>M. aeruginosa</i>
Picadas 2003	1 semana	57,9	103,2 16/10/2003	<i>M. aeruginosa</i>

Tabla I.9. Afloramientos de cianobacterias encontrados en los embalses de la Comunidad de Madrid. Clo *a* = concentración de clorofila *a*. Máx. = máxima.



Finalmente, nos quedaba confirmar si el valor utilizado para definir el afloramiento era correcto en todos los embalses o no, para ellos se representó este valor límite y las concentraciones de clorofila *a* en cada uno de los embalses (como en el caso anterior e caso de existir datos para dos puntos se representó la media aritmética para los dos valores) (Figura I.48). En esta figura podemos observar que en general el valor utilizado fue adecuado, los embalses de El Vellón, San Juan, Río Sequillo fueron los embalses en los que la clorofila *a* nunca se superó este valor y sus concentraciones de clorofila *a* fueron de las menores obtenidas, En los dos primeros las concentraciones se mantuvieron más o menos estables en los dos años, sin que apareciera ningún pico de clorofila *a* claramente superior a la media anual. El parece que dentro de este trío de embalses que mostró un pico que puede ser considerado un afloramiento y que no supero el valor límite es el embalse de Río Sequillo que en el mes de octubre del 2002 mostró un pico claramente superior a la media anual.

Los otros cuatro embalses analizados y que presentaron afloramientos puede ser divididos en dos grupos: uno definido por los embalses Lozoya, Santillana y Valmayor, y otro en el que encontraríamos a Picadas. En el primer grupo los tres embalses presentaron concentraciones de clorofila *a* superiores en el año 2002 a las que pudimos encontrar en el 2003. En el primero de los años los afloramientos que pueden observarse alcanzaron concentraciones de clorofila *a* tan elevadas que el valor límite que define afloramiento permite identificar correctamente los afloramientos que ocurrieron. Por otro lado en el año 2003, que presentó concentraciones inferiores de biomasa, solamente se superó este valor de referencia en dos de los embalses y de manera puntual (los afloramientos solamente duraron una semana), encontrándose en estos dos embalses (Santillana y Valmayor) cerca de este valor mínimo en otros momentos, en otras ocasiones aunque sin superarlo. El segundo grupo formado únicamente por el embalse de Picadas sin embargo, mostró un patrón de aparición diferente a los tres anteriores, en el año 2002 mostró un comportamiento similar al del embalse de río Sequillo en ese mismo año mostrando concentraciones bajas comparadas con otros embalses. Mientras que en el año 2003 presentó un comportamiento claramente diferente entre los dos puntos de muestreo, a pesar de estas desviaciones encontradas, parece que el valor definido parece ser útil en la definición del afloramiento encontrado en este año, permitiendo detectar casi todos los afloramientos que tuvieron lugar.



Resultados

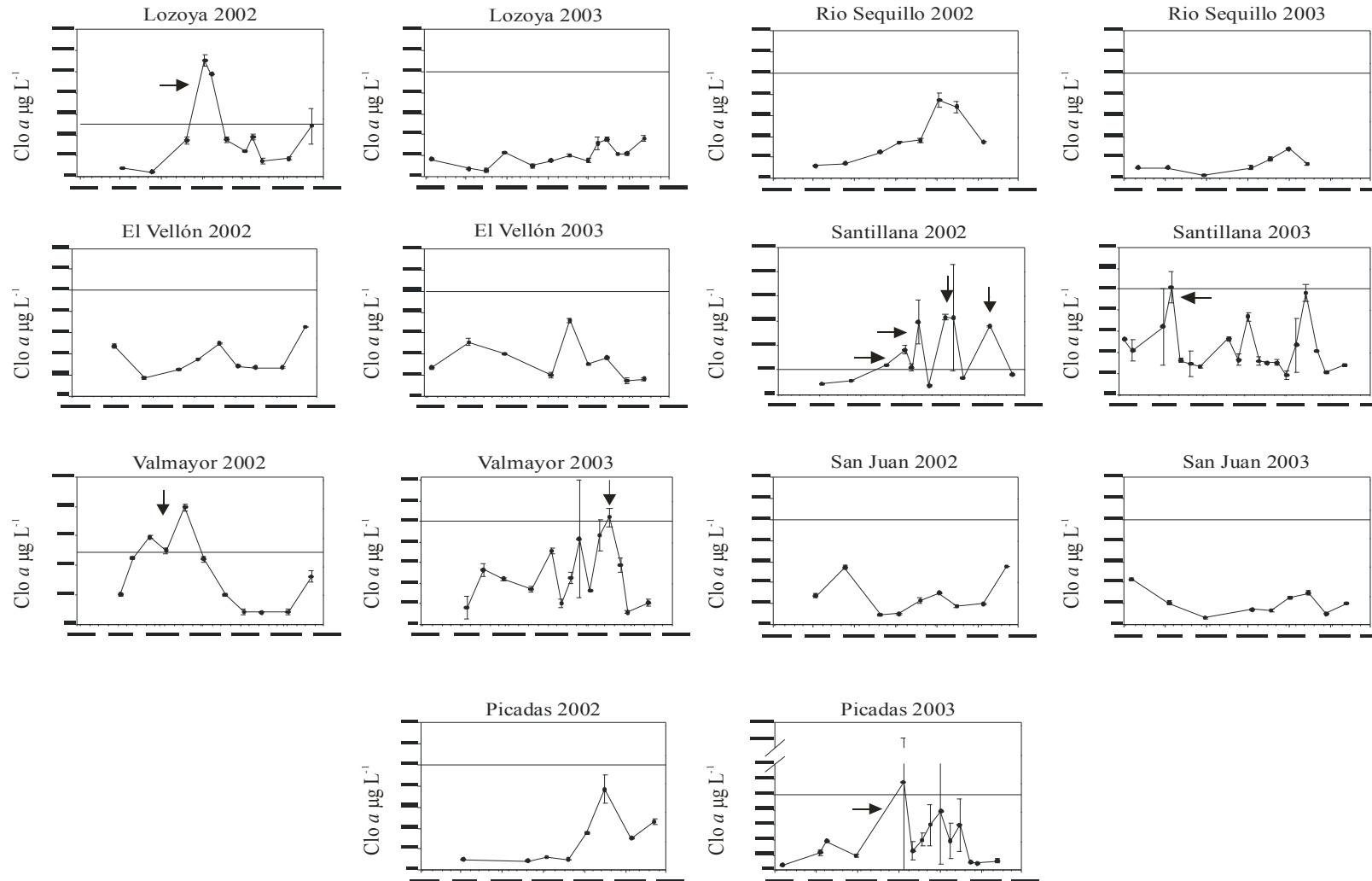


Figura I.48: Concentraciones de clorofila *a* en los embalses analizados y su comportamiento respecto al valor establecido para considerarlo un afloramiento. Con una flecha se marcan los momentos en que se ha considerado que estábamos ante un afloramiento. La línea marca el valor de 50 μg de Clo *a* L^{-1}



4.11. Estado trófico de los embalses analizados.

Los datos recogidos pueden ser utilizados para definir el estado trófico que presentan los embalses analizados, teniendo en cuenta que estos datos representan sólo parte del año y que faltan datos en de invierno y primavera que sería necesarios para definir sin lugar a dudas el estado trófico que los mismos presentan. A pesar de ello decidimos utilizar la clasificación de la OCDE para calcular cual era el estado trófico general de los embalses analizados calculando la media de la clorofila *a* y el fósforo total con todos los datos obtenidos para cada embalse (Tabla I.10), lo que nos permitiría como mínimo establecer una gradación de estado trófico entre los embalses. Según esta clasificación, Cinco de ellos se clasifican como eutróficos, e los dos restantes los embalses el de Santillana y El Vellón pueden ser clasificados de hipereutróficos, el primero de ellos para los dos parámetros analizados, el fósforo total y la concentración media de clorofila *a*, y el segundo solo para el fósforo total.

Embalse	Media P _{tot} ($\mu\text{g P L}^{-1}$)	Media Clo <i>a</i> ($\mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$)	Clasificación según la OCDE
Lozoya	65,7 \pm 26,7	24,8 \pm 29,9	Eutrófico
Río Sequillo	49,9 \pm 30,5	13,1 \pm 10,5	Eutrófico
El Vellón	152,1 \pm 32,6	16,6 \pm 7,6	Hipereutrófico
Santillana	146,1 \pm 104,6	47,1 \pm 49,7	Hipereutrófico
Valmayor	91,8 \pm 29,0	29,5 \pm 18,7	Eutrófico
San Juan	30,8 \pm 23,2	11,2 \pm 6,2	Eutrófico
Picadas	96,2 \pm 130,2	24,9 \pm 32,5	Eutrófico

Tabla I.10. Valores medios de fósforo total y clorofila *a* en los siete embalses analizados. P_{tot} = fósforo total. Clo *a* = concentración de clorofila *a*.



5. Discusión.

El agua es un recurso imprescindible para la vida y en gran parte de España es considerado como un recurso escaso. Por ello es de especial importancia tener un conocimiento exhaustivo de los compuestos u organismos que pueden afectar a su calidad. Los afloramientos de microalgas en general y de cianobacterias en particular son un factor que puede tener múltiples efectos sobre la calidad de este recurso (Metcalf y Codd 2004), aunque existen pocos estudios acerca que importancia tienen en nuestros embalses ((Moreno y col., 2005); (Aboal y Puig 2005); (Barco y col., 2004); (Sanchis y col., 2002); (Ariosa y col., 2005) y (Quesada y col., 2002)).

Estudios realizados con anterioridad mostraban que la existencia de este tipo de afloramientos en uno de los principales embalse de la Comunidad de Madrid (Sanchis y col., 2002), por lo que nos planteamos hacer un estudio más en profundidad que permitiera determinar cómo de importantes son las cianobacterias dentro de la población fitoplactónica en los embalses de la Comunidad de Madrid y si la formación de afloramientos podía considerarse un hecho común. Con ese fin se eligieron 7 de los principales Embalses de la Comunidad de Madrid que representan el 42,4% del total del agua embalsada que en Madrid.

Todos los embalses estudiados pueden clasificarse en función de su comportamiento térmico como monomícticos con un periodo de estratificación que ocurre de primavera hasta el otoño (Margalef 1983), en nuestro caso todos los embalses analizados se muestrearon cuando la termoclina estaba ya formada. La aparición de esta termoclina tiene importantes efectos sobre los nutrientes, las características físico-químicas y las variables biológicas, hace que las masas de agua estratificadas presenten concentraciones de nutrientes bajas en el epilimnion (capa superior) comparadas con las que existen en el hipolimnion (capa inferior). Cuando la estratificación se rompe (finales de octubre, principios de noviembre) se puede observar una brusca subida en la concentración de nutrientes, en especial de NID, efecto que se ha podido ver en todos los embalses analizados a excepción del de Río Sequillo en el año 2003, en el cual parece que no llegamos a ver la mezcla total al realizar el último muestreo en el mes de octubre y no en el mes de noviembre como en el resto de embalses. Analizando más



en profundidad el comportamiento de este NID se pudo ver que durante el periodo de estratificación (antes de la rotura de la termoclina) el componente fundamental de este nitrógeno inorgánico es el amonio, sin que sea posible, en la mayor parte de los casos, detectar la presencia del otro componente fundamental del DIN, el nitrato. Esto cambia cuando tiene lugar la rotura de la termoclina, en este momento la importancia de cada uno de estos compuestos en el NID cambia, la concentración de nitrato sufre un gran incremento que lo convierte en el componente mayoritario. Esto queda de manifiesto cuando analizamos las correlaciones del NID con las distintas variables donde observamos una correlación del 0,9 con el nitrato y solamente del 0,5 con el amonio, lo que es debido a que en los momentos en que la concentración de NID es alta, el componente principal de este es el nitrato. La concentración de amonio obviamente también se incrementa, pero no en la misma proporción que el nitrato. Esto puede deberse a que al romperse la termoclina se produce una oxidación del amonio (componente mayoritario del DIN en el hipolimnion) al encontrarse con una mayor concentración de oxígeno. La idea de que este incremento se deba en gran parte a la escorrentía superficial no puede descartarse, aunque el año 2002 se caracterizó por presentar un otoño poco lluvioso y hasta mediados de noviembre (con posterioridad a la subida del nitrato) no se observaron incrementos en la cantidad del agua embalsada, lo que indica una baja escorrentía superficial (o una mayor demanda de agua), y las tendencias de nitrato en DIN fueron similares a las encontradas en el 2003 que presentó una mayor escorrentía.

Respecto al fósforo soluble, para el cual únicamente existen datos para el año 2003, se mantuvo en general en niveles por debajo del límite de detección hasta el mes de octubre, prácticamente el final del periodo de muestreo. Existen dos embalses que sin embargo se apartan de esta tónica, Santillana y El Vellón, en los cuales fue posible detectar fosfato soluble durante casi durante todo el periodo para el cual existen datos. Se ha publicado que el fósforo reactivo soluble es el principal factor que explica la dominancia de las cianobacterias no fijadoras de nitrógeno (p. e *Microcystis*) (Xie y col., 2003), parte de nuestros datos parecen estar de acuerdo con esta hipótesis, por ejemplo en los dos embalses anteriores los momentos en los que se produce un aumento de la concentración de clorofila *a* coincide con bajadas en una inmovilización de este fosfato soluble. Esta reducción puede observarse de manera puntual en otros embalses como el de Picadas, pero el hecho es que en la mayoría de las muestras no fue posible detectar la presencia de fosfato soluble y que existen muestras en las



cuales la presencia de fósforo soluble (como en el embalse de Santillana en los meses de septiembre y octubre) o en general en los meses de octubre en el resto de los embalses sin que esto implicara un incremento en la concentración de clorofila *a*. La razón de este comportamiento puede deberse a que son muy numerosos los factores que implican el crecimiento de las algas como ya hemos indicado en la introducción (Oliver y Ganf 2000), de hecho se han descrito múltiples recursos como limitantes para el fitoplancton ((Hecky y Kilham 1988); (Huisman y Weissing 2001)). Además la metodología utilizada en este trabajo dificulta la obtención de datos que apoyen esta hipótesis, los pulsos de fósforo deben en teoría ser muy cortos al tener los organismos una gran avidez por el, lo que produciría la inmovilización del mismo transformándolo en fósforo total con gran rapidez. El hecho de que en pocos de los embalses analizados sea posible detectar la forma reactiva soluble del fósforo hasta la rotura de la termoclina, apoya la idea de que el fósforo reactivo soluble nada más se incorpora al sistema es tomado por las organismos. Para poder obtener datos validos, la frecuencia de muestreo debería haber sido muy superior al que se ha utilizado en este estudio. Seis de los embalses analizados pueden clasificarse de eutróficos y en todos ellos cianobacterias potencialmente tóxicas han dominado la población fitoplanctónica durante extensos periodos de tiempo. Si unimos estos dos factores, hemos de concluir que todos ellos pueden potencialmente dar lugar a importantes biomásas de organismos potencialmente tóxicos, afloramientos, y como hemos visto en los datos la presencia de afloramientos es un hecho común en varios de los embalses analizados. Aunque los intentos por determinar si las concentraciones de fósforo total afectaban a las especies u ordenes de cianobacterianas presentes no han tenido éxito. Aunque el embalse que presentó un valor mayor, el embalse de Santillana, ha sido dominado fundamentalmente por *M. aeruginosa*, lo que estaría de acuerdo con lo defendido por (Xie y col., 2003), esta especie ha dominado también en el embalse de Valmayor que tróficamente hablando presentó valores similares al embalse de Lozoya, un embalse que podemos considerar dominado por especies del genero *Anabaena*, lo que indicaría que existen múltiples factores, además del P, que controlan si en un embalse aparecen fundamentalmente Nostocales o Chroococales.

Después queda comentar cómo el fósforo total y las relaciones NID/P_{tot} y NID/P_{sol} afecta a la clorofila *a* y a los grupos algales. Estos factores junto con el nitrógeno total (N_{tot}) y la relación N_{tot} – P_{tot} (que no fueron medidos en este trabajo), son las variables que más se



han utilizado para explicar o predecir en que embalses van a dominar las cianobacterias (p.e. (Downing y col., 2001), (Xie y col., 2003), (Hecky y Kilham 1988)). Aunque ni los estudios de laboratorio ni los estudios ecológicos globales en lagos, proporcionan pruebas concluyentes de si alguno de ellos juega un papel preponderante para que las cianobacterias sean dominantes en el ecosistema (Downing y col., 2001). En nuestro caso ninguna de las relaciones (ni NID/Ptot, ni NID/Psol) se ha correlacionado con los grupos algales presentes. Ya se ha descrito que en ningún caso hay leyes determinísticas que expliquen la dominancia de las cianobacterias (Pearl y col., 2001), es mas ya ha sido propuesto que por lo menos la relación $N_{tot} - P_{tot}$ puede no ser causa de los afloramientos de cianobacterias si no su resultado (Xie y col., 2003). En nuestro caso sólo una de las variables presenta una correlación fuerte tanto con la clorofila *a* de cianobacterias, como con los otros tipos clorofila *a*, este es el fósforo total. Esta correlación ha sido descrita como una manera de predecir la dominancia de cianobacterias en lagos canadienses (Downing y col., 2001), aunque en nuestro caso se correlaciona con la clorofila *a*, tanto total, de cianobacterias como de algas verdes. Desde nuestro punto de vista esta correlación como ya ha sido descrita para la relación $N_{tot} - P_{tot}$ es debida a los afloramientos de cianobacterias y no causa del mismo. En nuestros embalses que se caracterizan en general por presentar bajas concentraciones de fósforo soluble, al menos en el año 2003 para el cual existen datos, podemos considerar que el fósforo total se comporta más como una medida de biomasa que como un factor que controlara la aparición de cianobacterias. Aunque como defiende (Huisman y Hulot 2005) en nuestro caso no hemos diferenciado entre especies fijadoras o no fijadoras que podrían tener diferentes requerimientos en las relación N-P y por lo tanto esa puede ser la razón por la cual no hemos obtenido una correlación clara entre las relaciones, NID/Psol (para el año 2003) y NID/Ptot y la cianobacterias.

En cuanto a las variables físico-químicas podemos establecer dos grandes grupos, uno son las variables que se encuentran directamente influenciados por los organismos que se aparecen en el sistema, en especial por el fitoplancton, estos son el oxígeno disuelto, el pH y la turbidez. Por otro lado nos encontramos las variables que en principio dependen en fundamentalmente de las características ambientales no biológicas como son la temperatura y la conductividad. La temperatura se comporta en todos los embalses analizados de manera casi idéntica, puesto que al encontrarse todos ellos en una zona geográficamente pequeña



todos ellos reciben una cantidad de energía del sol similar no existiendo diferencias significativas entre ellos. Esta variable si tiene como cabe esperar un gran efecto sobre los nutrientes (como podemos observar en la tabla de correlaciones), pues el gradiente de temperatura es el responsable de la formación de la termoclina. Resulta curioso el efecto significativo que la temperatura presenta sobre el porcentaje de algas verdes que presenta esta presente en un momento determinado, aunque correlación positiva sea muy pequeña (0,16). Esto podría indicar que, las elevadas temperaturas favorece a las algas verdes y no a las cianobacterias como había sido publicado con anterioridad (Robarts y Zohary 1987) y que como hemos indicado en la introducción (Oliver y Ganf 2000), haciendo que las algas verdes dominen a las cianobacterias en los meses calidos. Algo que confirmaría los estudios iniciales que indicaron que las algas verdes se desarrollan especialmente en los meses de verano cuando las temperaturas del agua son elevadas (por ejemplo en el embalse de Sau entre los años 1964 y 1972 (Margalef 1983)). Finalmente, la conductividad presentó exclusivamente efectos sobre el porcentaje de los dos grandes grupos, algas verdes y cianobacterias además de manera inversa, favorece a las algas verdes y negativamente a las cianobacterias, eso si, los valores de Pearson fueron muy bajos y podrían deberse un resultado espurio, puesto que en general las variaciones de conductividad en los embalses analizados tampoco en muy grande.

Respecto a las características físico-químicas que están directamente influenciados por la actividad biológica, el pH fue en casi todo momento básico en los embalses analizados, esta basificación del medio esta correlacionada positivamente con la clorofila *a* (con valores cercanos a valores 0,5 del coeficiente de correlación de Pearson, en el caso de la clorofila *a* total medida por métodos espectrofotométricos y ligeramente superiores en el caso de la clorofila *a* total medida por métodos fluorométricos). La razón que podría explicar correlación sería la modificación del equilibrio carbónico-bicarbonato que ocurre en lagos y embalses debido a la producción primaria que retira carbono inorgánico del medio (Margalef 1983) y que obviamente depende de la cantidad de biomasa presente (del cual la clorofila *a* es su principal indicador) . Algo similar pasa con el oxígeno disuelto, que es un subproducto de la fotosíntesis oxigénica por lo que también tiende a correlacionarse con la clorofila *a*. Y finalmente nos queda hablar de la turbidez que es debida a las partículas en suspensión. Este parámetro por tanto en sistemas no turbulentos que remuevan el sedimento, depende en parte de los organismos fotosintéticos que flotan, a mayor biomasa mayor turbidez como ocurre en



este caso. Para estas dos últimas variables la correlación no es tan buena como la que observamos en el caso del pH, porque otros factores como el viento, puede modificar tanto el oxígeno en disolución al facilitar el intercambio con la atmósfera, lo cual disminuye la fuerza de la correlación entre estos dos factores y la biomasa medida como clorofila *a*.

Durante el periodo analizado son dos los grupos mayoritarios que se han encontrado, las algas verdes y las cianobacterias, los otros dos grupos diatomeas y pueden considerarse minoritarios. Como media el 47% de la clorofila *a* pertenecía a cianobacterias, mientras que la algas verdes representó el 33% de la concentración de clorofila *a* lo que indica que las cianobacterias son el grupo fitoplanctónico más importante en los embalses estudiados de la Comunidad de Madrid. Además, estos grupos son en general autoexcluyentes, como indica la fuerte correlación negativa que presentan los % de cada uno de ellos. Este mayor dominio que presentan las cianobacterias sobre las algas verdes, ya ha sido estudiado en múltiples trabajos y las posibles explicaciones han sido ya descritas en la bibliografía, este trabajo no permite indicar cual de ellas es la responsable de este dominio, pero posiblemente las razones más plausibles que lo explican son: su capacidad para controlar su flotación ((Huisman y Hulot 2005) y referencias dentro de ella), la producción de compuestos con efectos alelopáticos sobre los posibles competidores algales, lo que les permitiría desplazar a las algas verdes en este caso (p.e (Kearns y Hunter 2000) (Kearns & Hunter 2001)) y la resistencia a la depredación que presentan las cianobacterias, no solamente por que en muchos casos su tamaño y su forma impiden su depredación (Burns 1968), sino porque no son un alimento nutricionalmente adecuado para ellos al carecer por ejemplo de ácidos grasos esenciales para el desarrollo del zooplancton (Nielsen 2006). Desde nuestro punto de vista como ya hemos indicado una de las ideas más extendidas que explica el dominio de las cianobacterias en función de la concentración de fósforo sería una consecuencia y no una causa. Lo que ocurriría simplemente es que las cianobacteria pueden alcanzar poblaciones mayores que el resto de los grupos fitoplactónicos que presentan tasas de predación menores que las algas verdes, sus principales competidores, esta capacidad de alcanzar poblaciones mayores implicaría que son capaces de alcanzar concentraciones de fósforo total mayores. Desde luego existen otras posibles explicaciones que ayudarían a explicar como las cianobacterias son capaces de alcanzar poblaciones mayores que las algas verdes, como serían: la flotación, que les permite concentrarse en la superficie y así concentrar el fósforo total en una zona



determinada, o la producción de compuestos alelopáticos, que les permitiría ser mejores competidores desplazando a al resto de los grupos algales y por tanto alcanzar mayores biomasa. Por ejemplo (Candfield y col., 1989) encontró débiles correlaciones entre nutrientes (concentraciones y ratios) y dominancia de cianobacterias, pero fuerte con la biomasa algal presente, lo que podría apoyar nuestras hipótesis, de que la relación entre el fósforo total y la biomasa de cianobacterias no sea una causa sino un efecto.

El periodo de estudiado, como hemos comentado, coincidió con el periodo en el que las especies de cianobacterias potencialmente tóxicas dominaron la población de cianobacterias planctónicas presentes, este mismo periodo de dominio se ha observado en otros países del área mediterránea como por ejemplo Grecia (Cook y col., 2004) donde el periodo de dominio coincidió con el periodo analizado en este trabajo de Junio a Noviembre, o en Israel las cianobacterias dominaron en el lago Kinneret (el antiguo mar de Galilea) en verano y en otoño (Zohary 2004). En otras zonas europeas, por ejemplo en Centroeuropa, este dominio de la población por parte de las cianobacterias potencialmente tóxicas comienza ligeramente antes que en zonas mediterráneas, en mayo, continuando hasta el mes de noviembre. Esta diferencia en el periodo de dominio parece que es debido a la importancia que en esos países presenta un género cuya importancia en la región mediterránea es menor *Planktothrix* que parece ser capaz de dominar al población en este primer momento ((Fastner y col., 1999); (Willame y col., 2005)) adelantando el periodo de afloramientos respecto a los países mediterráneos. *Microcystis*, el género cianobacterias mas importante en el mediterráneo, comienza a ser importante en junio, tanto en Centroeuropa, como en la zona mediterránea ((Fastner y col., 1999); (Cook y col., 2004)).

Los tres géneros principales de cianobacterias planctónicas encontrados en la Comunidad de Madrid han sido; *Microcystis*, *Aphanizomenon* y *Anabaena*, estos junto con el género *Planktothrix* son también los géneros potencialmente tóxicos más abundantes en Europa y se caracterizan por dominar los cuerpos de aguas monomícticos eutróficos, como los encontrados en la Comunidad de Madrid, y que presentan tanto una fuerte estabilidad en la columna de agua y los nutrientes que facilitan el crecimiento masivo de estos organismos (Reynolds 1981). Junto con estas tres géneros hemos encontrado otro que de manera puntual (excepto en el embalse de Lozoya donde dominó parte del año 2003) se ha localizado en



algunos de los embalses y que en la actualidad se cree que en ocasiones también podría presentar cepas tóxicas: *Woronichinia* y que ha sido descrito como relativamente abundante en los cuerpos de aguas estudiados en Bélgica y Luxemburgo (Willame y col., 2005) donde se situó en el mismo grupo de abundancia que *Anabaena* y *Aphanizomenon* y después de los dos géneros más comunes en centroeuropea *Microcystis* y *Planktothrix*.

En total se han detectado 9 especies diferentes, pero no todas presentan la misma importancia. La especie mayoritaria en nuestra región es *M. aeruginosa*, la especie planctónica potencialmente tóxica posiblemente más importante en la zona mediterránea (Cook y col., 2004), no sólo porque es abundante entre la población cianobacteriana de los embalses, si no que también parece tener una mayor capacidad para alcanzar grandes poblaciones dando lugar a afloramientos. Un ejemplo de esto es el hecho de que la mayor parte de los afloramientos encontrados en este trabajo estaban dominados por esta especie. En la zona escandinava tan importante como *M. aeruginosa*, son las especies pertenecientes al género *Anabaena* (Sivonen y col., 1992), en centroeuropa como ya hemos indicado con anterioridad *P. rubescens* es tan importante como *M. aeruginosa*. Tras esta especie nos encontramos con un grupo de especies *M. flos-aquae*, *Aph. flos-aquae* y *A. flos-aquae*. Finalmente en la zona mediterránea serían las cuatro últimas especies las dominantes (Vardaka y col., 2005), que coinciden con las que hemos encontrado en este trabajo. *M. aeruginosa* parece la clara dominadora en los embalses de la Comunidad de Madrid, cuando aparece en un embalse, en el 50% de las veces representa el 50% o más de la población de cianobacterias en el 50%, lo que da a esta especie una importancia fundamental en los embalses de la zona. Este valor es mayor al encontrado en Alemania (Fastner y col., 1999) y similares a los encontrados en otros países mediterráneos, como en Grecia (Cook y col., 2004). Este valor de abundancia relativa es claramente superior a las cianobacterias que se presentaron en el alrededor del 25% de las muestras analizadas. Sin embargo, las especies raras *W. naegeliana*, *A. sp* y *M. wesenbergii* no presentaron diferencias significativas con *M. aeruginosa* cuando consideramos únicamente las muestras positivas y no las totales. Esto parece indicar que cuando estas especies aparecen, lo cual ocurre en un número muy bajo de ocasiones, pueden llegar a representar una parte importante de la población de cianobacterias. Una posible causa de esto sería que estas cianobacterias aparecen en uno o en dos embalses (El Vellón 2003 en el caso de *M. wesenbergii* y Lozoya 2003 en el caso de *W. naegeliana*) lo



que significaría que estas especies presentan un rango ecológico más estrecho que el resto, razón por la cual aparecen en tan pocas muestras. Pero si las condiciones para que estas especies aparezcan, se presentan, las especies se muestran muy eficientes llegando a dominar la población. En el otro extremo encontraríamos a *M. aeruginosa* que presentaría unos requerimientos ecológicos más amplios, esto le permite aparecer un mayor número de muestras, además esa amplitud de requerimientos ecológicos que presenta, le permitiría desplazar al resto que aparecen en sus mismas situaciones. Para analizar cuales eran las especies suelen aparecer juntas, se realizó el estudio factorial, lo que nos permitió establecer dos grandes grupos. Por un lado aparecen *M. aeruginosa*, *M. flos-aquae* y *Aph. flos-aquae* y por otro lado dos especies de *Anabaena* y *W. naegeliana*. A la hora de estudiar los grupos funcionales propuestos por (Reynolds y col., 2002) que se basan en las asociaciones funcionales que presenta un organismo, de manera que los organismos con requerimientos ecológicos similares aparecen asociados *Aphanizomenon* al ser una cianobacteria fijadora debería coincidir con *Anabaena* y por lo tanto deberían asociarse y tener requerimientos ecológicos similares. Esta asociación *Anabaena/Aphanizomenon* se ha encontrado en lagos Griegos (Vardaka y col., 2005). Sin embargo, cuando analizamos los datos obtenidos en este estudio encontramos una asociación diferente, *Aph. flos-aquae* no se asocia con las especies del género *Anabaena*, sino con *Microcystis*, esto parece indicar que en este caso tanto *Aph. flos-aquae* como *Microcystis* presentan requerimientos similares, a pesar de que una es una especie fijadora de nitrógeno. De hecho los intentos de detectar fijación biológica de nitrógeno en muestras dominadas por *Aph. flos-aquae* en el embalse de Santillana se encontraron siempre por debajo del límite de detección (D. Sanchis comunicación personal). Además, en la bibliografía existen ejemplos en las que estas dos cianobacterias codominaron en los afloramientos (Welker y col. 2003), como ha ocurrido por ejemplo en los embalses de Santillana y Valmayor. Esto nos hace creer que en este caso el considerar a *Aph. flos-aquae* asociada a otras fijadoras de N_2 , podría no ser la única posibilidad, puesto que en nuestro caso parece ser que presenta requerimientos ecológicos similares a los que tiene *M. aeruginosa*, como confirma el hecho de que coincidan en muchos casos en el mismo momento en el mismo embalse, codominando la población de cianobacterias. Mientras *A. flos-aquae* se alejaría de *Aph. flos-aquae* y serviría de puente con el otro gran grupo que incluiría, a las otras dos especies de *Anabaena* identificadas y *W. naegeliana*. Es curioso que los dos grupos fundamentales presenten miembros de orden Chroococcales y Nostocales mezclados, lo cual



parece insinuar que la distribución en grupos funcionales propuesta por (Reynolds y col., 2002) no es adecuada para los embalses en estudio. Finalmente, *M. wessenbergii* parece tener un rango ecológico mucho más estrecho que las otras dos especies del género *Microcystis* puesto que no se asocian entre ellos, eso sí, cuando estas condiciones se dan parece tratarse como hemos indicado antes de una especie que presenta una competitividad muy grande, siendo capaz de dominar la población de cianobacterias de una manera muy eficiente.

Muchos afloramientos de cianobacterias han sido descritos en la bibliografía en las últimas décadas, pero no hay ninguna definición plenamente aceptada de que es un afloramiento. Como ya hemos visto en la introducción que una de las más aceptadas es la de establecer un límite de $10 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$ cuando las cianobacterias son dominantes (Oliver y Ganf 2000). Pero como todas las definiciones que proponen un valor límite igual para todos los embalses y situaciones, son difíciles de aplicar, por ejemplo si aplicáramos esa definición a los embalses analizados en este trabajo todos los embalses presentarían afloramientos y en muchos casos este se extendería durante prácticamente o todo el periodo de muestreos. Esto chocaría con la idea de afloramiento, que es el crecimiento de algas por encima de la media. Esta falta de definición clara de lo que es un afloramiento dificulta la comparación de datos, puesto que lo que para un investigador es un afloramiento puede no serlo para otro y viceversa. Por ello nos hemos decidido por poner un valor basal mínimo para todos los embalses analizados que se base en la concentración de clorofila *a* media que ocurre durante el periodo de muestreos.

Nuestra definición de $50 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$, puede parecer alta para muchos países y situaciones, sin embargo parece apropiada para este estudio y posiblemente es adecuado para los embalses españoles en particular y para los embalses y lagos mediterráneos en general. Puesto que salvo en uno de los embalses analizados el de Río Sequillo, parece que ha sido capaz de detectar todos los afloramientos producidos. Con este valor límite, cuatro de los siete embalses analizados en este trabajo y cinco de los ocho embalses analizados en la Comunidad de Madrid ((Barco y col., 2004) (Almodovar y col., 2004)) presentaron afloramientos de cianobacterias. La presencia de afloramientos de cianobacterias parece mayor en los embalses analizados que en otras zonas del área mediterránea como Grecia donde únicamente el 27% de los embalses analizados presentaban afloramientos de cianobacterias (Cook y col., 2004). Esto



podría explicarse por varias razones, una de ellas es que la frecuencia de muestreo utilizada en este trabajo, mayor que en el trabajo anterior, el único que de este estilo que existe en la zona mediterránea. Normalmente en estos trabajos gran cantidad de embalses son muestreados con frecuencias menores a las utilizadas en este trabajo (por ejemplo 2 veces en todo el verano) con el fin de ampliar la búsqueda a la mayor cantidad de cuerpos de aguas posibles. Una mayor frecuencia de muestreo podría permitir detectar un mayor número de afloramientos, puesto que como hemos visto en este trabajo presentan una corta duración (de menos de una semana). Otras posibles explicaciones serían la propia definición de afloramiento o que los embalses analizados presenten una mayor probabilidad de presentar afloramientos de cianobacterias que otros embalses analizados en la zona mediterránea.



CAPÍTULO II



Microcistinas en embalses de la Comunidad de Madrid (CAM)

1. Introducción

Dentro de la gran diversidad de compuestos que pueden ser producidos por las cianobacterias uno de los más importantes, tanto por el efecto tóxico que presenta como por lo abundante que es en los cuerpos de aguas dulces, es la microcistina (Fastner y col., 1999). El nombre de microcistinas se debe al organismo del cual se aislaron por primera vez, *Microcystis aeruginosa* (Carmichael y col., 1988).

1.1. Estructura química de las microcistinas.

Químicamente hablando, las microcistinas son heptapéptidos cíclicos que poseen varios aminoácidos no proteinogénicos (Figura II.1). El más característico de ellos es el ácido (2S,3S,8S,9S) – 3 – amino – 9 – metoxy – 2, 6 ,8 – trimetil – 10 – fenildeca – 4 ,6 – dienoico, también conocido por el nombre de Adda. Este aminoácido también es característico de otro grupo de toxinas muy relacionadas, las nodularinas. Además de este aminoácido, la estructura general de las microcistinas presenta otros 6 aminoácidos, los más comunes son: D-alanina (D-Ala), D-eritro-β-metil-aspartico (D-MeAsp), D-glutamato (D-Glu), N-metildehidroalanina (Mdha) y dos aminoácidos variables denominados genéricamente X y Z, estos dos últimos son siempre L-aminoácidos, normalmente los dos únicos isómeros L presentes en la molécula (Gulledge 2002). En lo que respecta a la estructura espacial de estos compuestos (Figura II.2) se asemejan a una silla de montar con la cadena lateral del Adda sobresaliendo sin mostrar ninguna estructura bien definida (Trogen y col., 1998).



Existen 71 diferentes variantes de microcistinas descritas hasta el momento (Codd y col., 2005a), teniendo todas ellas una masa molecular de alrededor de 1000 Da (entre 900 y 1100), son solubles en agua y, exceptuando posiblemente las más hidrofóbicas, son incapaces de atravesar la membrana celular. Debido a su estructura química estos compuestos son extraordinariamente estables, tolerando grandes variaciones en la química del agua donde se encuentran disueltos, como por ejemplo cambios en el pH ((Harada y Tsuji 1998); (Harada K.I. y col., 1996)).

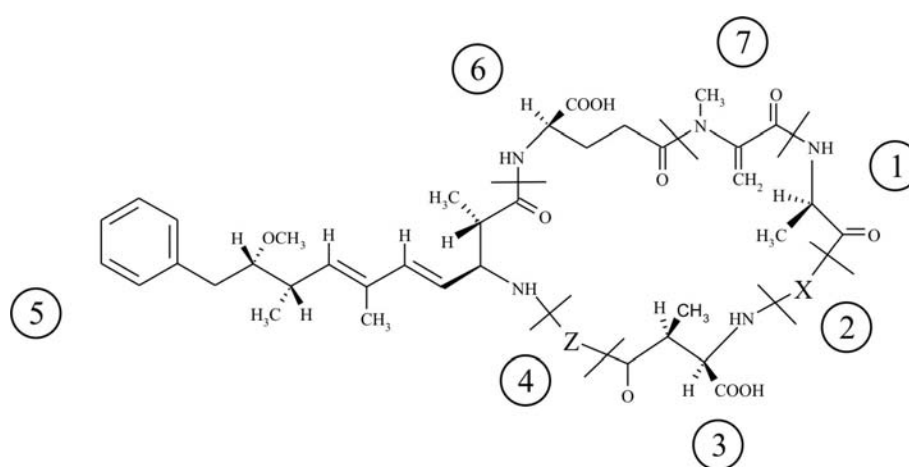


Figura II.1: Estructura general de las microcistinas. ciclo-(D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷).

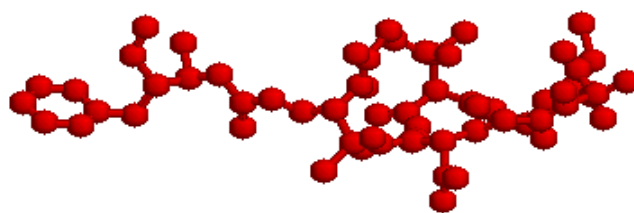


Figura II.2: Estructura tridimensional de la microcistina. Para aumentar la claridad de la estructura en silla de montar las cadenas laterales de los aminoácidos variables (X y Z) no han sido representadas.



Existiendo tantas variantes químicas de microcistinas, un aspecto muy importante es el establecimiento de una nomenclatura que nos permita una rápida identificación del compuesto del que estamos hablando. La nomenclatura de estos compuestos se basa en los dos aminoácidos variables X y Z, genéricamente hablamos de la “microcistina XZ” derivando su nombre de la nomenclatura del código de una letra de los aminoácidos. Aparte de estos dos aminoácidos variables, se han encontrado modificaciones en todos los aminoácidos que forman parte de la molécula, las cuales se incluyen en el nombre cuando están presentes, siendo las dos modificaciones más frecuentes las desmetilaciones en los residuos 3 (D-MeAsp, se incorpora al nombre D-Asp³) y 7 (D-Mdha, se incorpora al nombre Dha⁷) (Sivonen y Jones 1999). Dentro de estas 71 variantes, las toxinas más frecuentes en el ecosistema, parecen ser la microcistinas LR, RR, YR y sus variantes desmetiladas en los residuos 3 y 7.

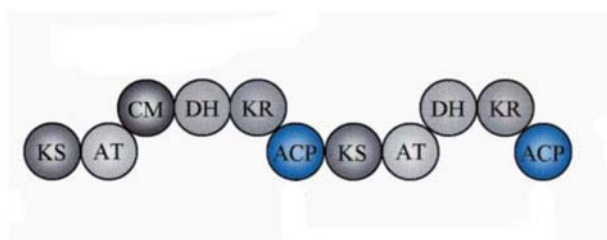
1.2. Síntesis de las microcistinas

Las microcistinas no están codificadas en el ADN, son sintetizadas por una ruta alternativa a la vía ribosomal. La síntesis implica a dos tipos de enzimas, sintetetas peptídicas no-ribosómicas (NRPS) y las poliquétido sintetas (PKS). Las NRPS son una gran familia de proteínas modulares, en las que cada modulo se encarga de la activación, modificación y condensación de cada uno de los aminoácidos que forman los péptidos no ribosómicos (Figura II.3). Por otro lado, las PKS son las enzimas responsables de la síntesis del Adda. Esta familia de enzimas, también modulares, son capaces de producir un gran número de compuestos a partir de los siguientes grupos: acetilos, propionilos o butirilos (Figura II.3), todos ellos son activados por su unión a Coenzima-A. Los compuestos que pueden producir las PKS a partir de estos monómeros mínimos son de una enorme diversidad (Cane y col., 1998). Químicamente todos son definidos como compuestos que contienen alternativamente grupos carbonil y grupos metilenos. Las PKS son muy comunes en el mundo bacteriano y gracias a ellas se producen un gran número de compuestos bioactivos con importantes funciones farmacológicas entre ellos algunos son: antibióticos como la eritromicina A, supresores



de la respuesta inmune como la rapamicina o compuestos anticancerígenos como la epotilona B (<http://linux1.nii.res.in/~pkssdb/polyketide.html>).

Mcy B: NRPS



Mcy D: PKS

Figura II.3: Ejemplo de modularidad de las NRPS y las PKS. C = dominio de condensación, A = Adenilación, Negro = Tiolación, KS = β - Cetoacil sintasa, AT = Acil tranferasa, CM = C-metiltransferasa, DH = Dehidratasa, KR = Cetoacil reductasa, ACP = Proteína transportadora del grupo acilo. Extraído de Tillett y col., 2000.

Como hemos indicado con anterioridad para sintetizar las microcistinas son necesarias por un lado las NRPS responsables de la unión de los diferentes aminoácidos y de las PKS responsables de la síntesis del compuesto más característico de las microcistinas: el Adda.

Hasta el momento se conoce la estructura génica de la región responsable de la producción de microcistinas en 4 organismos (3 especies). Dos cepas de *Microcystis*: *M. aeruginosa* PCC 7806 (Tillett y col., 2000) y *M. aeruginosa* K-139 (Nishizawa y col., 2000), una de *Anabaena*: (Rouhiainen y col., 2004) y una de *Planktothrix* (Christiansen y col., 2003). En estos organismos todas las enzimas responsables de la síntesis de



microcistinas se encuentran agrupadas en un único operón, si bien la estructura del mismo varía en cada caso.

Microcystis fue el primer organismo en el cual se secuenció el promotor responsable de la síntesis de microcistinas, este tiene un tamaño aproximado de 55 Kpb, y en total codifica 10 proteínas, 6 de las cuales son enzimas multifuncionales con dominios PKS y NRPS. Los 10 genes en este organismo se organizan alrededor de un promotor bidireccional (Figura II.4), hacia un lado y en el siguiente orden nos encontramos: *mcy A*, *mcy B*, *mcy C* (NRPS) implicados en la síntesis del péptido (Tillett y col., 2000). En la dirección contraria nos encontramos: *mcy D*, *mcy E*, *mcy F*, *mcy G*, *mcy H*, *mcy I* y finalmente *mcy J*. Por otro lado, los operones de los otros dos géneros difieren del encontrado en *Microcystis*. En el género *Anabaena* los genes se encuentran ordenados de manera diferente como puede verse en la Figura II.4 y en *Planktothrix* aparece un promotor unidireccional justo antes de *mcy D* (Figura II.4).

De los diez genes mencionados, ocho se encuentran implicados directamente en la producción de las microcistinas (Figura II.5). Posiblemente la proteína codificada por *mcy G* es el iniciador de la síntesis y parece ser la encargada de activar el fenilacetato (dominio NRPS), que posteriormente es transferido a la 4-fosfopanteteína del primer dominio transportador. A continuación, los 4 dominios PKS que poseen *Mcy G* prosiguen con la síntesis del Adda el cual es terminado de sintetizar por las proteínas *Mcy D* y *Mcy E*. Esta última enzima, que también es un híbrido PKS-NRPS, será la encargada de proporcionar el enlace en β entre el grupo amino de Adda y el glutamato, gracias al dominio de condensación (NRPS) que esta enzima posee, uniendo la parte PKS de la síntesis con la parte NRPS. Posteriormente y en orden de actuación actúan las siguientes enzimas: *Mcy A* y *Mcy B* que incorporan los cuatro siguientes aminoácidos (dos cada uno) y *Mcy C* que incorporará el último (Tillett y col., 2000). La molécula obtenida se cree que con la ayuda de otra enzima se terminará de ciclar (Christiansen y col., 2003). La función de las cuatro enzimas restantes son (Tillett y col., 2000):



- ⇒ *Mcy J* es responsable de la O-metilación del Adda
- ⇒ *Mcy F* es una racemasa que posiblemente es la encargada de proporcionar el D-aspartico y lo mas probable también D-metil-aspartico
- ⇒ *Mcy H* posee homología con transportadores ABC y parece estar implicado en el transporte de las microcistinas, siendo imprescindible para su síntesis (Pearson y col., 2004).
- ⇒ *Mcy I* de función actualmente desconocida.

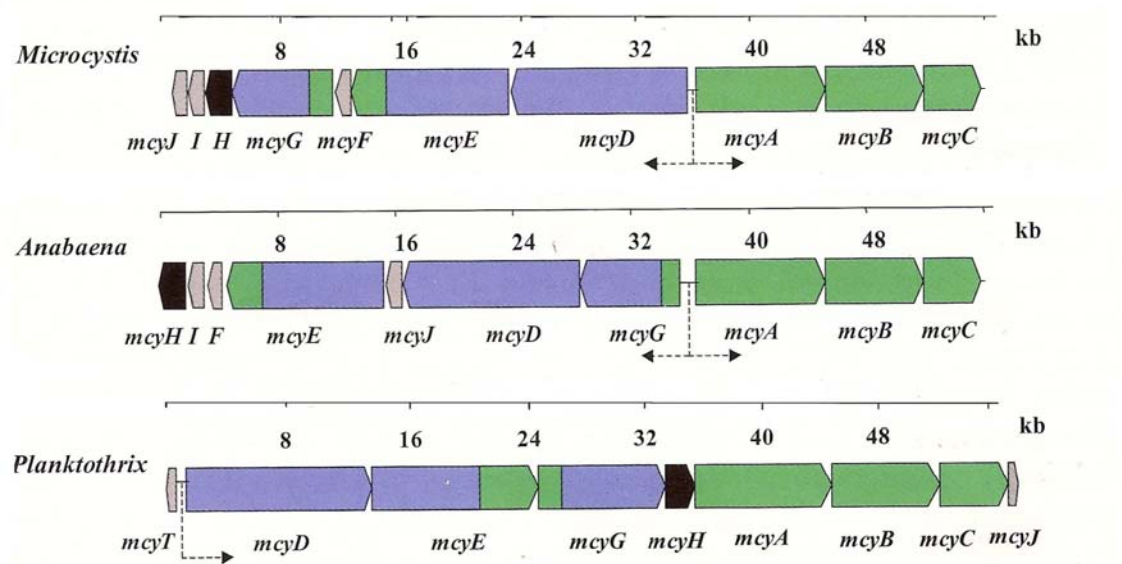


Figura II.4: Estructura del operón responsable de la síntesis de microcistinas en los diferentes organismos en los que se conoce su estructura. En negro esta marcado el transportador ABC, en verde las péptido sintetetasas, en azul las polipéptido sintetasas y en gris las enzimas modificadoras . Extraído de Börner y Dittmann 2005.

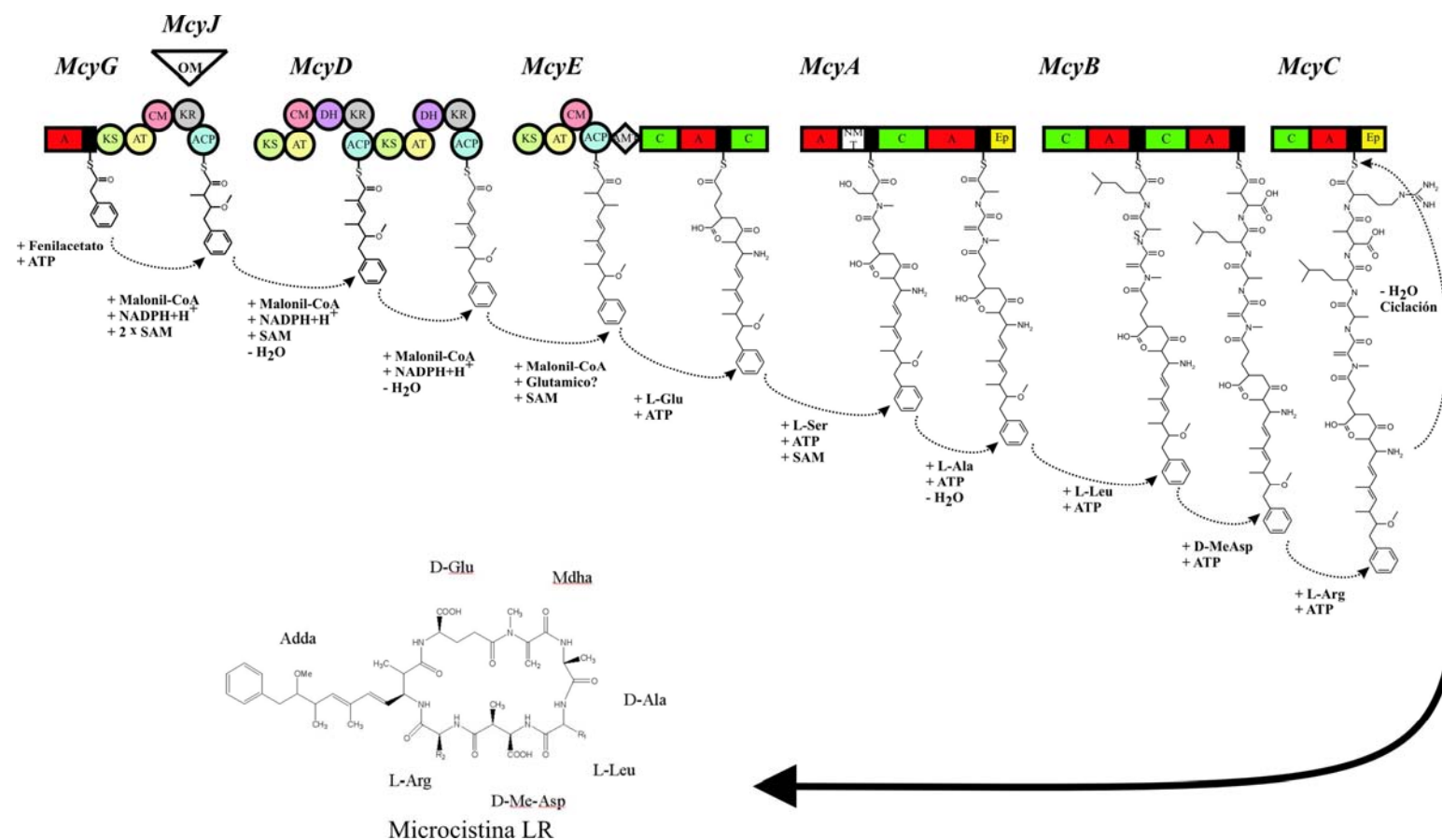


Figura II.5: Modelo propuesto para la formación de la microcistina LR. Los rectángulos representan los dominios péptido sintetasa, A = aminoacil adenilación, C = condensación, AMT = aminotransferasa, el rectángulo negro representa el motivo de tiolación de las NRPS. Los círculos representan los motivos de las poliquétidos sintetasa, KS = β cetoacil sintetasa, AT = acetiltransferasa, ACP = Proteína transportadora del grupo acilo, KR cetoacilreductasa, DH= deshidratasa, CM = CM = C-metiltransferasa, OM = O-metiltransferasa. (extraído de (Tillett y col., 2000))



1.3. Organismos productores

Las cianobacterias son los principales organismos productores de microcistinas. Dentro de este *Filum* no todos los géneros poseen especies productoras, así los géneros descritos como potencialmente productores (aquellos en los cuales se han encontrado especies productoras) más importantes son: *Microcystis*; *Planktothrix*; *Anabaena*; *Oscillatoria*; *Nostoc*; *Anabaenopsis*; *Hapalosiphon*; (Sivonen y Jones 1999) *Woronichinia* (Cronberg y col., 1999) y *Aphanocapsa* (Domingos y col., 1999). Si bien, ni todas las especies de estos géneros poseen la capacidad de producir microcistinas ni dentro de una especie productora todas las cepas son productoras. Diferentes estudios de campo han intentado establecer un porcentaje de riesgo para los diferentes géneros cianobacterianos potencialmente productores. Probablemente uno de los más completos, en cuanto al número de muestras analizadas, es el trabajo realizado por Fastner y colaboradores 1999, calculó el porcentaje de muestras que presentaban microcistinas cuando la especie dominante pertenecía a uno de los tres géneros productores más comunes en los embalses y lagos europeos: *Microcystis*, *Planktothrix* y *Anabaena*. Los datos obtenidos mostraban que en esta situación casi el 100% de las muestras presentaban microcistinas.

El género cianobacteriano productor de microcistinas más común en la zona mediterránea es el género *Microcystis* (Cook y col., 2004), dentro del cual las especies más comunes son: *M. aeruginosa*, *M. flos-aquae*, *M. viridis* y *M. wesenbergii*. Como hemos indicado anteriormente no todas las especies presentan la misma probabilidad de producir microcistinas. Aun así, dentro de este género se puede establecer una gradación en cuanto a la probabilidad que presentan cada una de estas especies de ser tóxicas, este es: *M. aeruginosa* > *M. flos-aquae* > *M. wesenbergii* (Via-Ordorika y col., 2004) (Figura II.6). En el caso del género *Planktothrix* las dos principales especies, *P. agardii* y *P. rubescens* (Figura II.6), se caracterizan por un elevado riesgo de producir microcistinas, siendo en el caso de *P. rubescens* cercano al 100%, puesto que dentro de lo que nosotros sabemos, en todas las especies aisladas y siempre que se ha analizado un afloramiento donde este organismo ha sido dominante se han detectado este tipo de toxinas. En cuanto a la producción de microcistinas por el género *Anabaena* (Figura



II.6), la dificultad que presenta su taxonomía hace que muchas de las cepas aisladas no estén caracterizadas a nivel de especie, sin embargo los trabajos realizados en los que se ha identificado la especie muestran que *A. flos-aquae* y *A. lemmermanii*, son la de mayor probabilidad de ser tóxicas, si bien diversos autores las consideran la misma especie (Geitler 1932).

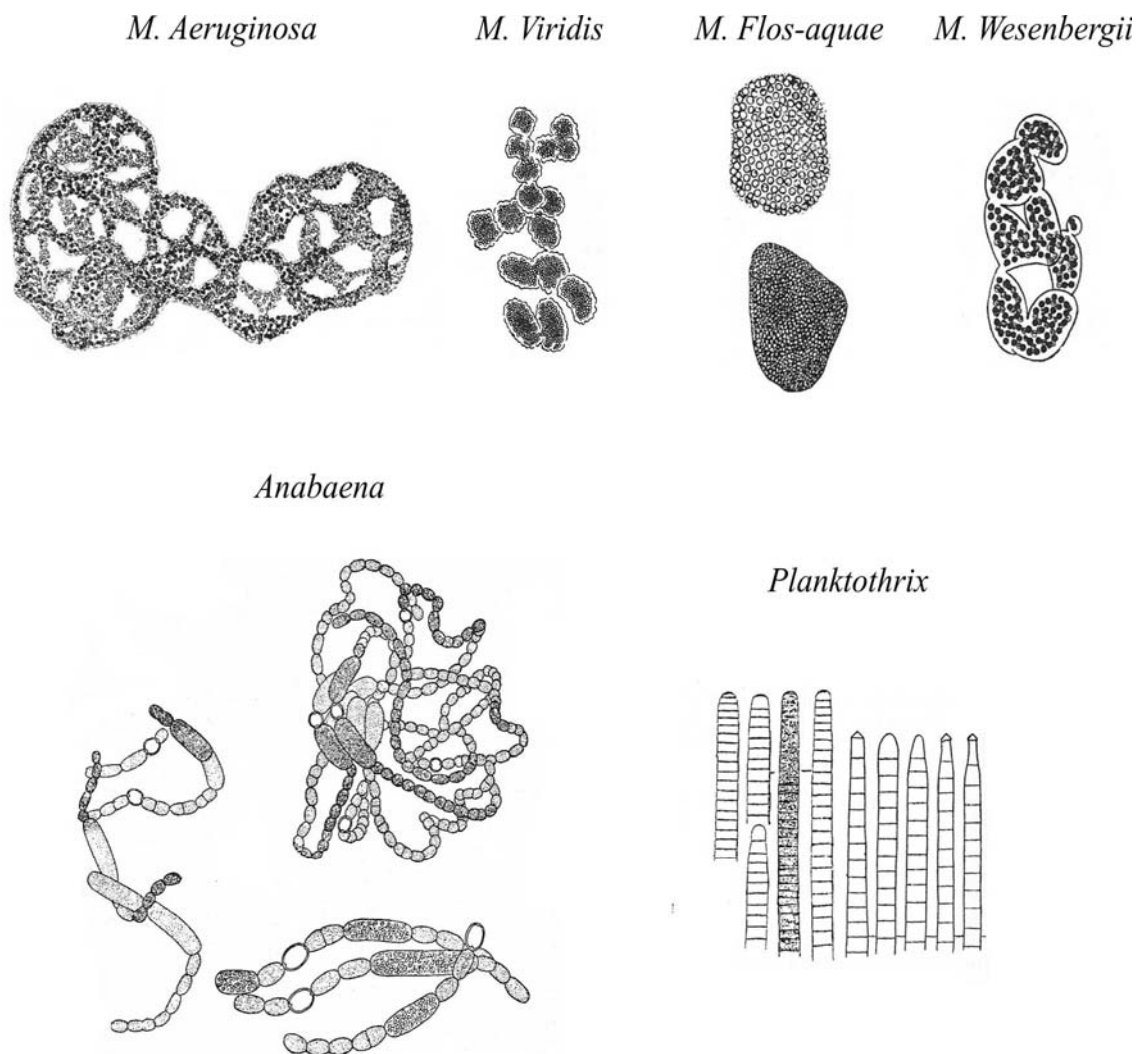


Figura II.6: Cianobacterias productoras de microcistinas más comunes en lagos y embalses Europeos. Extraído de Geitler 1932 y Komarek y Anagnostidis 1999.



1.4. Función de las Microcistinas

Una de las cuestiones que con más frecuencia se hacen acerca de las microcistinas, es si presentan alguna función dentro de los organismos que las producen, hasta ahora se han propuesto varias hipótesis:

- ⇒ Defensa contra depredadores.
- ⇒ Implicación en fotosíntesis.
- ⇒ Molécula quelante de hierro.
- ⇒ Molécula implicada en señalización.
- ⇒ Molécula implicada en división celular.

Ninguna de las hipótesis ha sido demostrada ni completamente descartada, existiendo para cada una de ellas datos experimentales que les sirven de apoyo. La defensa contra los depredadores se apoya por un lado por su efecto tóxico sobre muchos de ellos y por otro porque su producción parece responder a la presencia de posibles depredadores aumentando la concentración intracelular (Jang y col., 2003). Su implicación en fotosíntesis está apoyada porque su localización intracelular mayoritariamente radica en los tilacoides (se trata de una endotoxina que se encuentra casi en su totalidad en el interior celular) (Lahti y col., 1997). Aunque el mutante de *Microcystis* sp. 7806, incapaz de sintetizar este tipo de compuestos, no parece estar afectado en la fotosíntesis lo que crea dudas acerca de esta hipótesis (Hesse y col., 2001). Su posible función como quelante de hierro se ha intentado explicar, por un lado a través de estudios químicos que demuestran la capacidad quelante que este compuesto posee (Utkilen y Gjølme 1995) y por otro lado porque en el operón responsable de su síntesis se han encontrado posibles promotores reconocidos por la proteína Fur, factor sigma implicado en la regulación del metabolismo del hierro (Martín-Luna y col., 2006 congreso). Las dos últimas posibilidades nombradas en la lista inicial, han sido las que ha aparecido en la escena científica más recientemente y se basan en el primer caso en la utilización de técnicas de proteómica que permitieron identificar una proteína con homología a otra relacionada con quórum sensing y en la segunda porque el mutante incapaz de sintetizar microcistinas formaba sincitios con mayor frecuencia que el silvestre (Claußner y col., 2004).



1.5. Toxicidad de las microcistinas

Hasta ahora hemos hablado de la estructura, síntesis y funciones de las microcistinas, pero quizás la razón que hace tan interesante a este grupo de compuestos es su efecto sobre otros organismos. Hasta el momento se ha detectado que estos compuestos son tóxicos para: plantas, bacterias, invertebrados no artrópodos, artrópodos y vertebrados (desde peces a mamíferos) (Wiegand y Pflugmacher 2005). Este amplio rango de organismos afectados se debe a la inhibición específica sobre las proteín-fosfatasas PP1 y PP2A que poseen estos compuestos (Dawson 1998). Esta inhibición se debe a que el Adda es capaz de unirse covalentemente al residuo de cisteína que las dos enzimas poseen en su centro catalítico, Cys-266 en el caso de la PP1 (Mackintosh y col., 1995) y Cys-273 en el caso de la PP2A (Runnegar y col., 1995). No obstante, no es necesaria esta unión covalente y únicamente es necesario que el residuo de Adda se sitúe en el bolsillo hidrofóbico del centro activo para inhibir la acción de las enzimas (Goldberg y col., 1995). La importancia de este aminoácido (Adda) queda de manifiesto porque modificaciones estructurales en el mismo o su eliminación dan lugar a la desaparición de la inhibición sobre la PP1 y PP2A (Abdel-rahman y col., 1993). Asimismo, la linearización del péptido y la presencia de enantiómero Z (isómero geométrico) en el doble enlace del Adda (C6) dan lugar a una disminución en inhibición ((Nishiwaki-Matsushima y col., 1991); (Bourne y col., 1996)). Cuando examinamos las constantes de disociación de las microcistinas y las proteín-fosfatasas nos encontramos que debido a la fuerte capacidad inhibitoria de las toxinas, las constantes exactas sólo pueden obtenerse por extrapolación de la concentración de fosfatasa a cero. Con esta extrapolación se obtiene un rango de 0,06-6 nM para la PP1 y 0,01-2 nM para la PP2A (Dawson 1998).

Cuando se estudia el efecto de las microcistinas sobre el organismo completo un factor muy importante en la toxicidad es la vía de entrada por la cual este compuesto entra en el organismo y del organismo que se estudia. En principio las microcistinas, excepto probablemente las más hidrofóbicas, sólo pueden atravesar la membrana si existe algún transportador que las reconozca, el transportador que reconoce a esta familia de compuestos es el de ácidos biliares y por lo tanto los daños observados en



mamíferos suelen localizarse fundamentalmente en el hígado. Una vez dentro de los hepatocitos el efecto sobre las proteín-fosfatasas da lugar a una hiperfosforilación del citoesqueleto, específicamente los filamentos intermedios y las citoqueratinas 8 y 18 (Toivola y col., 1997). Esto produce una desestructuración general del citoesqueleto que da lugar a la desaparición de los hepatocitos provocando una hemorragia centroglobular (Figura II.7) (Toivola y col., 1998) que termina por producir la muerte. Las microcistinas potencialmente pueden afectar a otros organismos si son capaces de entrar en el citoplasma celular.

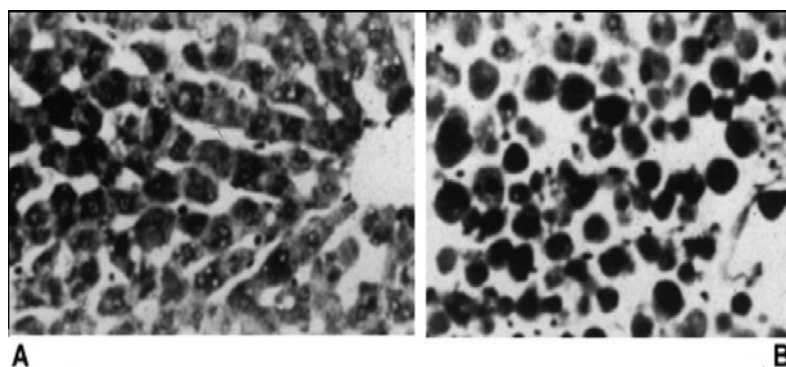


Figura II.7: aspecto del hígado del ratón después de una dosis letal de Microcistina LR. A = hígado control. B = hígado después de una dosis letal. extraída de Azevedo y col., 2002.

No todos los tipos de microcistinas existentes poseen la misma toxicidad y estas diferencias no pueden explicarse solamente por su efecto sobre las proteín-fosfatasas (Ito y col., 2002), pues existe mucha mayor diferencia entre la toxicidad intraperitoneal de por ejemplo Mc-LR y Mc-RR ($DL_{50} = 50 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $DL_{50} = 600 \mu\text{g kg}^{-1}$) (Sivonen y Jones 1999) que entre las diferentes constantes de inhibición que presentan, donde la mayor diferencia se observa sobre la PP2A, donde la K_i de la Mc-LR es el doble de la Mc-RR, lo que indicaría que existen otros factores aparte del efecto sobre las proteín-fosfatasas que afectarían a la DL_{50} , lo que podría explicarse por dos causas: una mejor detoxificación y una mejor excreción de las microcistinas menos tóxicas como parecen indicar los datos experimentales en ratones (Ito y col., 2002).



Aparte de este efecto directo causado por la unión de las microcistinas sobre la PP1 y PP2A, podemos observar otro indirecto. El proceso de detoxificación de las microcistinas implica acomplejar este compuesto con glutatión (Ito y col., 2002). Cuando una concentración suficientemente alta de un compuesto tóxico aparece en los hepatocitos, como resultado indirecto, la cantidad de glutatión reducido en el hígado disminuye y aumenta la probabilidad de daño por estrés oxidativo. Este incremento de especies reactivas del O_2 , parece ser el causante del daño que sobre el DNA son capaces de causar las microcistinas (Wiegand y Pflugmacher 2005).

1.6. Microcistinas en el ecosistema

El efecto de las microcistinas en el ecosistema no está clara. Parece obvio que, ecológicamente hablando, los mamíferos, que son los organismos más sensibles a estos compuestos, no son la diana a nivel trófico. Por ello, es interesante conocer al menos someramente cuáles podrían ser los efectos sobre otros grupos de organismos, algunos de los cuales sí entran en competencia directa con las cianobacterias productoras de microcistinas.

Entre los organismos que pueden entrar en contacto con las microcistinas o sus productores en los lagos y embalses nos encontramos a:

- ↗ Otros grupos fitoplanctónicos.
- ↗ Plantas acuáticas.
- ↗ Zooplancton.
- ↗ Bivalvos.
- ↗ Crustáceos.
- ↗ Peces.
- ↗ Aves.
- ↗ Mamíferos.



En primer lugar vamos a hablar del efecto que tienen las microcistinas sobre los otros organismos que forman parte del fitoplancton. Este efecto se ha detectado tanto en campo como en laboratorio, si bien en este último caso las relaciones se han realizado de manera indirecta y parecen indicar efectos alelopáticos de las cianobacterias productoras de microcistinas con otros miembros del fitoplancton (Wiegand y Pflugmacher 2005). Los efectos directos encontrados en estudios de laboratorio de estos compuestos sobre otros miembros del fitoplancton han sido varios, por ejemplo Singh y col., 2001 mostraron que la microcistina LR aumentaba la lisis de cianobacterias no productoras como *Nostoc muscorum*. Mientras que su efecto sobre un alga verde como *Chlamydomonas reinhardtii* fue la disminución en la motilidad y por tanto el posterior aumento en la sedimentación (Kearns y Hunter 2001).

El efecto de las microcistinas sobre las plantas acuáticas ha sido escasamente investigado. Por ejemplo la presencia de *Microcystis* en co-cultivo con *Lemna minor* reduce su crecimiento (Weiss y col., 2000). Mientras que la microcistina soluble también parece afectar a este tipo de organismos por ejemplo el macrófito *Ceratophyllum demersum* veía reducido su crecimiento en presencia de concentraciones tan bajas como $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Pflugmacher 2002). El mecanismo de toxicidad de las microcistinas en las plantas es claramente diferente al descrito para animales, puesto que las plantas carecen del órgano diana de estas toxinas característico en animales. En este caso la toxicidad se da por un aumento de estrés oxidativo, que aparece al disminuir la cantidad de glutatión reducido en el interior celular al intentar la planta detoxificar las microcistinas presentes en su citoplasma uniendo este glutatión a la microcistina libre (Wiegand y Pflugmacher 2005), este incremento en las concentraciones de oxígeno reactivo intracelular es el responsable de los daños que se producen en las células vegetales.

La inhibición del zooplancton por las microcistinas se considera una de las posibles funciones de las microcistinas, lo que unido a la estructura física de algunos productores potenciales como por ejemplo *Microcystis* (formación de colonias), dificulta el que en general el zooplancton se alimente de estos organismos. Cuando se estudia el efecto de las microcistinas y del organismo productor más estudiado,



Microcystis, sobre diferentes miembros del zooplancton, por ejemplo sobre *Daphnia* nos encontramos muy diversas reacciones, por ejemplo, *Daphnia pulicaria* parece ser la menos sensible del grupo, mientras que *Daphnia pulex* es la más sensible (Wiegand y Pflugmacher 2005). *Daphnia magna* tiene un comportamiento curioso, es insensible a la microcistina disuelta, pero no a la ingestión de células de especies productoras de microcistina, de hecho la exposición previa a un *Microcystis* tóxico incrementa su resistencia (Gustafsson y Hansson 2004). Por otro lado, otros organismos como el copépodo *Diaptomus birgeri* muestran una sensibilidad intermedia a las cepas tóxicas de *Microcystis* (Demott y col., 1991). Como podemos apreciar existe una gran diversidad en cuanto al efecto que estas toxinas tienen sobre los que supuestamente son sus organismos diana.

Los peces parecen ser en general poco sensibles a las microcistinas. De hecho, las mortalidades en masa que se han detectado durante afloramientos tóxicos se han asociado más con cambios de pH o la bajada en la tensión parcial de O₂, que con la presencia de estas toxinas. Los órganos diana son como en mamíferos el hígado y también el riñón y las células epiteliales de las branquias (Wiegand y Pflugmacher 2005). Una importancia especial de este tipo de organismos viene dada por que pueden ser considerados una vía alternativa para la entrada de microcistinas en la cadena trófica que desemboca en los seres humanos (De Magalhaes y col., 2001) por su potencial acumulación en los músculos de algunas especies.

Múltiples ejemplos de muerte de animales y aves se encuentran a lo largo de la historia como resultado de ingestión accidental, al beber o comer afloramientos o “tapetes” de cianobacterias que estaban formados por especies productoras de microcistinas. Los animales que han resultado fundamentalmente afectados han sido vacas y perros (Codd y col., 2005b). Dentro de las aves tienen particular importancia las muertes masivas de flamencos que recientemente han tenido lugar en diversos lugares del mundo como España (Alonso-Andicoberry y col., 2002), Estados Unidos (Chittick y col., 2002) y Kenia (Ballot y col., 2004; Krienitz y col., 2003).



1.7. Efectos de las microcistinas sobre los seres humanos

Un punto aparte merecen los efectos de las microcistinas sobre los seres humanos, como ya hemos comentado en la introducción general diversos casos de intoxicación por cianotoxinas se han publicado desde el siglo XIX hasta la actualidad.

Tanto la gastroenteritis como la hepatoenteritis son enfermedades comunes en los seres humanos debido a la gran cantidad de factores, especialmente infecciones víricas o bacterianas, que pueden causarlas. Debido a esta gran cantidad de posibles causas es difícil establecer una relación directa entre cianobacterias y estas sintomatologías que son comunes en casos de contaminación con microcistinas y sólo si se han detectado cianobacterias tóxicas se puede relacionar un posible envenenamiento por estos compuestos (Falconer 2005). Uno de los más claros ejemplos del efecto de las microcistinas sobre los seres humanos ocurrió en Australia (presa de Malpas, Armidale, Nueva Gales del Sur) (Falconer y col., 1980). En este embalse se detectó un afloramiento dominado por *M. aeruginosa* cerca de la toma de agua del mismo y como parte del tratamiento se utilizó sulfato de cobre, conocido alguicida que lisa las células, liberando así la microcistina almacenada en el interior celular al medio circundante. El posterior tratamiento de potabilización (cloración) se mostró inadecuado para la eliminación de este tipo de toxinas, muy estables al tratamiento tradicional con cloro. Ello quedó de manifiesto cuando posteriormente al acceder a los datos clínicos se detectó que el hígado de la población que había bebido agua contaminada había resultado dañado (se observó un aumento en las enzimas marcadoras de daño hepático). En el momento que esto ocurrió no existía la metodología que permitiera determinar la concentración de microcistina en agua, lo que impidió establecer relaciones entre dosis recibida y daño observado (Falconer y col., 1983).

Aunque existen datos contrastados de intoxicaciones agudas, es más complicado el estudio de la exposición a concentraciones subletales durante largos periodos de tiempo (exposición crónica). En este caso los datos epidemiológicos recogidos en China (Zhou y col., 2002; Yu 1995), correlacionan la presencia de microcistinas con el cáncer de hígado y de colon. Esto queda de manifiesto ante la existencia de datos de laboratorio



que sugieren que las microcistinas podrían causar procesos tumorigénicos, si bien esta actividad como promotor de tumores necesita ser comprobada por procedimientos estándar y la Organización Mundial de la Salud (OMS) todavía no considera a las microcistinas como molécula promotora de tumores (Falconer 2005).

1.8. Legislación.

Debido a los posibles efectos adversos sobre los seres humanos, en 1997 la OMS estableció un valor guía que pudiera ser utilizado por los países como una indicación que utilizar en sus legislaciones. Este valor fue obtenido utilizando los valores de NOAEL (No Observed Adverse Effect Level; “dosis máxima a la cual no se observan efectos adversos”), a partir de un estudio realizado en ratones e incorporando una serie de factores de incertidumbre. Este valor permite calcular una TDI (Tolerable Daily Intake; “ingesta diaria tolerable”) sin que aparezcan efectos negativos sobre el organismo. Para calcular este valor como hemos mencionado antes se han de establecer una serie de factores de incertidumbre, los utilizados fueron: 10 por la diferente sensibilidad dentro de cada especie, 10 por las diferencias entre especies y 10 por la limitación de datos disponibles. Todos juntos dan un factor de incertidumbre global de 1000.

$$\text{TDI} = \frac{40 \mu\text{g}/(\text{kg d}) (\text{utilizando datos de ratón})}{\text{Factor de incertidumbre}} = \frac{40}{1000} \mu\text{g}/(\text{kg d}) = 0,04 \mu\text{g}/(\text{kg d})$$

Con este valor TDI se puede calcular un valor guía para aguas de bebida que se calculó siguiendo la fórmula escrita a continuación y aplicando los siguientes factores: un peso corporal de 60 kg; un factor de 0,8 porque supone que el 80% de la microcistina que podemos tomar va a ser a través del agua y finalmente dividiendo por la estimación de agua que consume un adulto diariamente, 2 litros al día. Aplicando estos valores se obtiene:

$$\text{Valor Guía} = \frac{0,04 \times 60 \times 0,8}{2} = 0,96 \mu\text{g} / \text{L}$$



Redondeando este valor se obtiene el valor guía de la OMS $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Todos estos valores se han calculado utilizando los valores toxicológicos de la microcistina LR, única para la cual existen valores realistas de toxicidad, aunque no es la única toxina presente en ambientes acuáticos.

A partir de este valor guía una serie de países han puesto en marcha legislaciones con el fin de regular los valores máximos que deben cumplir las aguas de consumo (Chorus 2005), uno de ellos fue España que en 2003 presentó una legislación de aguas de consumo en la que estableció un valor máximo para aguas de consumo medido a la salida de la estación potabilizadora de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de microcistina total (Real decreto 140/2003).



2. Objetivos

Como hemos podido ver el capítulo anterior, la presencia de cianobacterias potencialmente productoras de microcistinas es común en las aguas de los embalses de la Comunidad de Madrid. En base a ello, los objetivos de este capítulo son:

- ⇒ Analizar la presencia y prevalencia de microcistinas en embalses utilizados para aguas de consumo en la Comunidad de Madrid, así como determinar las concentraciones a las que se presentan dichos compuestos
- ⇒ Identificar cuáles son los posibles organismos productores de estos compuestos en cada embalse analizado.
- ⇒ Identificar qué embalses dentro de los analizados muestran una mayor probabilidad de presentar este tipo de compuestos.
- ⇒ Establecer un periodo de máxima probabilidad de aparición de estas toxinas en la Comunidad de Madrid.



3. Materiales y Métodos.

3.1. Zona de Estudio.

La zona de estudio coincide con la descrita en el capítulo I.

3.2. Toma de muestras.

Se tomaron dos tipos de muestras para análisis de microcistinas: por un lado muestras de la fracción sestónica, esto es muestras no concentradas. Por otro lado muestras concentradas con una red de fitoplancton (Wildco 48-C60 USA,) de 80 μm de tamaño de poro. Las primeras muestras se tomaron de la misma manera que las muestras destinadas a su análisis taxonómico descrita en el capítulo anterior. Ambas muestras fueron tomadas entre 5 y 20 metros de la orilla (en función de la profundidad del embalse). Una vez situados, la red se lanzo a 10 metros de distancia, recogiendo la muestra justo por debajo de la superficie. Esto se repitió 10 veces (el volumen aproximado que fue concentrado, considerando un diámetro de boca de 13 cm. fue de 1300 litros). Posteriormente la muestra fue resuspendida en un volumen aproximado de 100 mL. Ambas muestras, concentradas y no concentradas, se guardaron a 4 °C hasta su procesamiento en laboratorio. Se tomaron dos muestras distintas en cada punto de muestreo dadas las grandes variaciones de concentración de microcistinas que éstas pueden presentar en los diferentes embalses y momentos de muestreo, variando de unos pocos ng L^{-1} hasta mg L^{-1} (en los acumulados que se formaron en la orilla). En las muestras que presentaban concentraciones en el orden de $\mu\text{g L}^{-1}$, su detección fue relativamente sencilla en muestras sin concentrar. Sin embargo, el estudio de la potencialidad de producción de microcistinas por el sistema requería concentrar previamente la muestra para poder determinar su concentración.



3.3. Determinación del contenido de clorofila a.

La concentración de clorofila *a* se realizó siguiendo el protocolo descrito en el capítulo I, extrayéndose en este caso tanto las muestras no concentradas, como las concentradas a través de la red de fitoplancton.

3.4. Determinación de clorofila y grupos algales por métodos fluorométricos.

La determinación de la concentración de clorofila *a* y la determinación fluorométrica de grupos algales se realizó como ha sido descrito previamente en el capítulo I.

3.5. Cultivo de la Cepa Microcystis aeruginosa UAM 247.

La cepa de *M. aeruginosa* UAM 247, fue crecida en BG-11 modificado (Sanchis y col., 2004) hasta fase estacionaria, momento en el cual se recogió por filtración con vacío suave a través de filtros de GF/F.

3.6. Extracción y análisis de microcistinas.

Las muestras para análisis de microcistinas fueron conservadas a 4 °C hasta su llegada al laboratorio donde fueron filtradas a través de filtros GF/F (Whatman, Gran Bretaña) de 47 mm de diámetro, con el mismo sistema utilizado para la determinación de clorofila. El volumen de filtración fue de 500 ml en el caso de la muestra no concentrada por red y de 30 ml en la muestra concentrada (siempre que la presencia de biomasa no recomendara su reducción). Una vez filtrada la muestra se conservó a -20°C hasta su extracción, concentración y análisis.



La extracción de las microcistinas se realizó por duplicado, para ello los filtros fueron extraídos con una solución metanol-agua 90% (90% metanol para análisis de Merck – 10% de agua mili-Rho). El filtro fue recortado e introducido en un tubo de centrifuga, se añadieron 4 ml de la solución de metanol 90%, y se agitó en un vortex Reax 2000 (Heidolph, Alemania) a máxima velocidad durante 2 min y posteriormente se introdujo en un baño de ultrasonidos Ultrasons (J.P.Selecta, España) durante 10 minutos y posteriormente se guardó a 4 °C durante 24 horas. Finalmente fue centrifugada a 5000 rpm en una centrífuga Labofuge Ae, equipada con un rotor basculante (Heraeus Sepatech, Alemania) y se retiró el sobrenadante. Este proceso fue repetido una vez más añadiendo otros 3ml de metanol 90%. Los dos sobrenadantes se conservaron a -20° C antes de concentrarse.

La concentración de la muestra se realizó en dos pasos, en un primer paso la muestra se llevó a sequedad con un rotavapor modelo R (Büchi, Suiza) a 40° C y se resuspendió en un volumen de 2 mL de metanol 100%, este se introdujo en un tubo eppendorf, y posteriormente se concentró mediante una centrifuga concentradora modelo Howe girovap GL (Girovap, Italia), también a 40 °C. Finalmente el extracto se resuspendió en un volumen 400 µL, doscientos de los cuales se pasaron a través de un filtro de nylon y se introdujeron en un vial de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) para su análisis.

El análisis de las muestras para detectar la presencia de microcistinas fue realizado con un HPLC modelo 2695 “Alliance”, con un inyector automático y un detector con un conjunto de diodos modelo 996 (Waters, EEUU). Para la separación cromatográfica se utilizó el gradiente descrito por Lawton y col., 1994 modificando la concentración del aditivo TFA (ácido trifluoro-acético) de 0,1% a 0,05%. Las dos fases móviles fueron agua miliQ + 0,05% TFA y acetonitrilo + 0,05% TFA. La columna utilizada fue Purospher RP 18 endcapped (5 µm) 4.6 mm x 250 mm (Merck, Alemania). Las microcistinas se identificaron por su tiempo de retención y espectro de UV característico (Meriluoto y Spoof 2005). La concentración de microcistina fue calculada relacionando el área obtenida para los picos identificados como microcistinas a 238 nm con los obtenidos a esa misma longitud de onda para cantidad conocidas de los tres



patrones de microcistina de los que se dispuso Mc-LR, YR y RR (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) (Figura II.8 y Figura II.9). La concentración de los picos para los cuales no se tenía patrón, se calculó relacionando el área del patrón de la microcistina Mc-LR con el área de esos picos de microcistina desconocida, y su concentración se calculó como “microcistina equivalente de Mc-LR”.

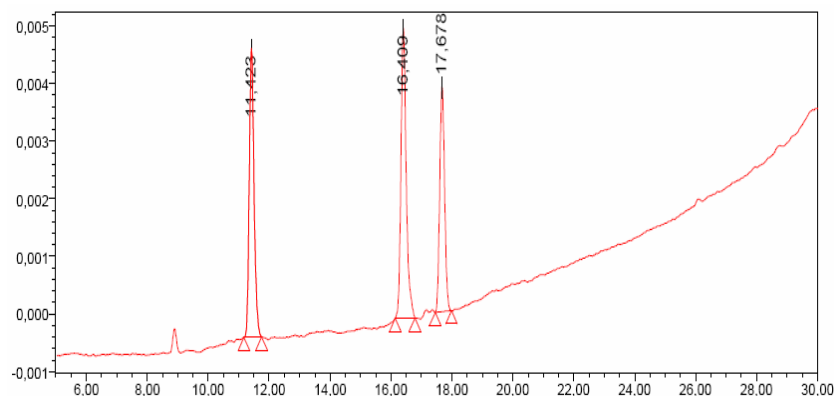


Figura II.8. Ejemplo de inyección de patrones de microcistinas. Por orden: microcistina RR (tiempo de retención 11,4), YR (tiempo de retención 16,4) y LR (tiempo de retención 17,7)

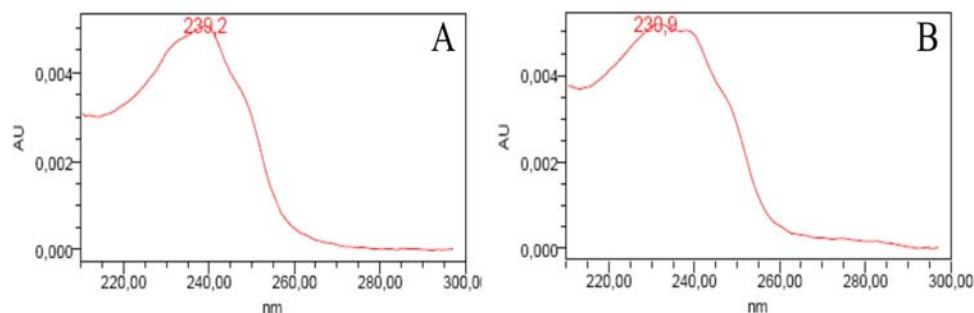


Figura II.9. Espectro característico de las microcistinas. La Figura A representa el espectro típico de las microcistinas que no poseen ni tiroxina ni triptófano en su molécula (por ejemplo Mc-RR o Mc-LR). La Figura B representa las microcistinas que poseen tiroxina en su molécula (Mc-YR), obsérvese el cambio del máximo de absorción.



4. Resultados.

Como hemos visto en el capítulo primero, todos los embalses analizados en la Comunidad de Madrid, que representan más del 40% del agua embalsada en la región, presentaron en algún momento del periodo de análisis (de julio a noviembre en 2001 y de Junio a noviembre de el 2002) cianobacterias que potencialmente eran capaces de producir microcistinas, siendo especialmente importantes las especies pertenecientes al género *Microcystis*. Esta alta presencia indica a priori que existe una elevada probabilidad de encontrar este tipo de toxinas en esta Comunidad Autónoma.

4.1. Limite de cuantificación.

Para determinar cual era la menor cantidad inyectada de microcistinas que nuestro sistema nos permitía detectar, se inyectaron concentraciones crecientes de microcistina LR (posiblemente la microcistina más importante de y la única para la se ha establecido un valor guía razonado) en el sistema cromatográfico utilizado en este trabajo. Para ello se inyectaron por triplicado las siguientes cantidades 10, 20, 50, 100, 500, 1000 y 2000 ng. En las condiciones experimentales utilizadas nuestro limite de detección y cuantificación fue de 20 ng inyectados, manteniendo una respuesta lineal a lo largo de todo el gradiente utilizado (Figura II.10). Este valor obtenido se encuentra muy próximo al valor publicado de 25 ng inyectados.

Con este limite de cuantificación y utilizando las condiciones de nuestro proceso de extracción y concentración e inyectando 100 µl de muestra, podemos calcular un limite de detección y cuantificación en condiciones ideales (definidas como la ausencia de otro compuesto que presente tiempos de retención similares) inferior a 0,02 µg L⁻¹, dos ordenes de magnitud inferior al valor guía establecido en la legislación vigente, si bien en muestras de campo se han detectado valores inferiores.



Limite de cuantificación

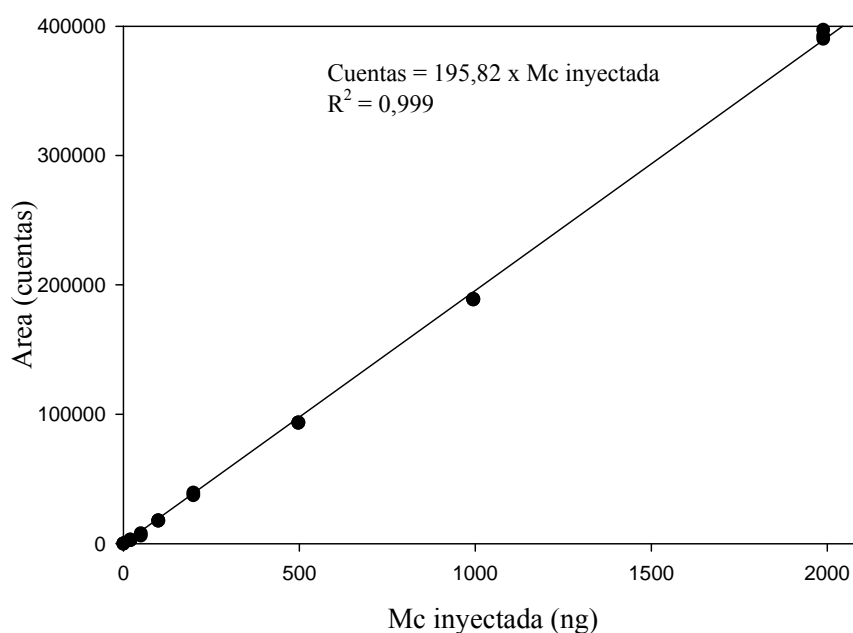


Figura II.10. Recta de regresión para la microcistina LR.

4.2. Eficiencia de Extracción de las toxinas

Con el fin de optimizar y definir cual era la metodología de extracción de las toxinas de las partículas retenidas en los filtros más eficiente entre las varias que han sido descritas, antes de realizar los análisis de microcistinas de las muestras de campo, se hicieron una serie de extracciones seriadas sobre el mismo filtro utilizando una cepa de *Microcystis aeruginosa* UAM 247 aislada del embalse de Santillana. Para ello se utilizaron dos concentraciones de metanol diferentes, 90% y 75% en solución acuosa (Tabla II.1), de cada una de las concentraciones se realizaron 4 repeticiones para cada uno de los tratamientos. Dentro de los valores obtenidos se consideró el mayor valor medio obtenido de los dos extractos como 100% de la toxina presente y se correlacionó con el otro valor para obtener el porcentaje extraído, los resultados obtenidos fueron:



Concentración de metanol	% de Mc Extraídas	SD
75 %	85 %	11
90 %	100 %	10

Tabla II.1. Efecto sobre la extracción de microcistinas en función de la concentración de metanol utilizada. SD = desviación estándar.

También se estudió cuántas extracciones eran necesarias para extraer con mayor eficiencia las microcistinas, para ello se realizaron tres extracciones consecutivas y se analizó el porcentaje sobre el total que presentaba cada una de ellas. Para ello se realizaron 4 repeticiones con metanol 90% (Tabla II.2) y se considero el 100% de la microcistina extraída a la suma de las tres extracciones. Los resultados obtenidos fueron:

Extracción	% de Mc Extraídas	SD
1º Extracción	92,8%	7,4
2º Extracción	6,9%	7,0
3º Extracción	0,3%	0,3

Tabla II.2. Efecto sobre la eficiencia de extracción, del número de extracciones consecutivas. % de Mc Extraídas, es el porcentaje de toxina obtenida en cada una de las extracciones respecto del total. SD = desviación estándar.

4.3. Microcistina en las Embalses de la Comunidad de Madrid.

En total se han analizado 170 muestras procedentes de 7 cuerpos de agua de la Comunidad de Madrid, los mismos que se analizaron en el capítulo I, estos son los embalses de: Lozoya, Río Sequillo, El Vellón, Santillana, Valmayor, San Juan y Picadas. En todos ellos fue posible identificar microcistinas en alguna de las muestras analizadas tanto en el 2002 como en el 2003. En total en el 65% (el 49% en 2002 y 74% en 2003) de las muestras concentradas por red fue posible detectar microcistinas, mientras que en las muestras no



concentradas en el 43% (31% en 2002 y 50% en 2003) las microcistinas se encontraron por encima del límite de detección.

La existencia de estos dos tipos de muestras nos permitirá analizar como afectan las dos metodologías más importantes en la recogida de muestras al análisis de microcistinas: la utilización de una red de fitoplancton y la toma de muestras sin concentrar filtradas directamente a través de filtros GF/F. Como consideración inicial hemos de indicar que la forma en que fueron tomadas las muestras de red no permite realizar una estimación cuantitativa de las mismas en $\mu\text{g L}^{-1}$, por la imposibilidad de realizar una medida precisa del volumen de agua que pasa a través de la red (un cálculo aproximado puede verse en Materiales y Métodos). A pesar de esto, este tipo de muestras si ofrecen una información muy válida en cuanto a presencia de este tipo de toxinas en los embalses objeto de estudio al permitirnos detectar concentraciones muy por debajo de lo que nos permitirían detectar las muestras sin concentrar. Mientras las muestras no concentradas nos permiten obtener las concentraciones volumétricas de microcistinas, valor de gran importancia en la gestión del recurso.

4.3.1. Presencia de microcistinas en el Embalse de Lozoya.

El embalse de Lozoya presentó microcistinas en los dos años estudiados, tanto en la fracción concentrada como en la no concentrada (Figura II.11) (Tabla II.3). Los momentos en que aparecieron este tipo de toxinas coinciden temporalmente en los dos años, a finales del verano principios del otoño, pero el número de muestras que presentaron microcistinas fue diferente, siendo mayor el número de muestras positivas en el año 2003.

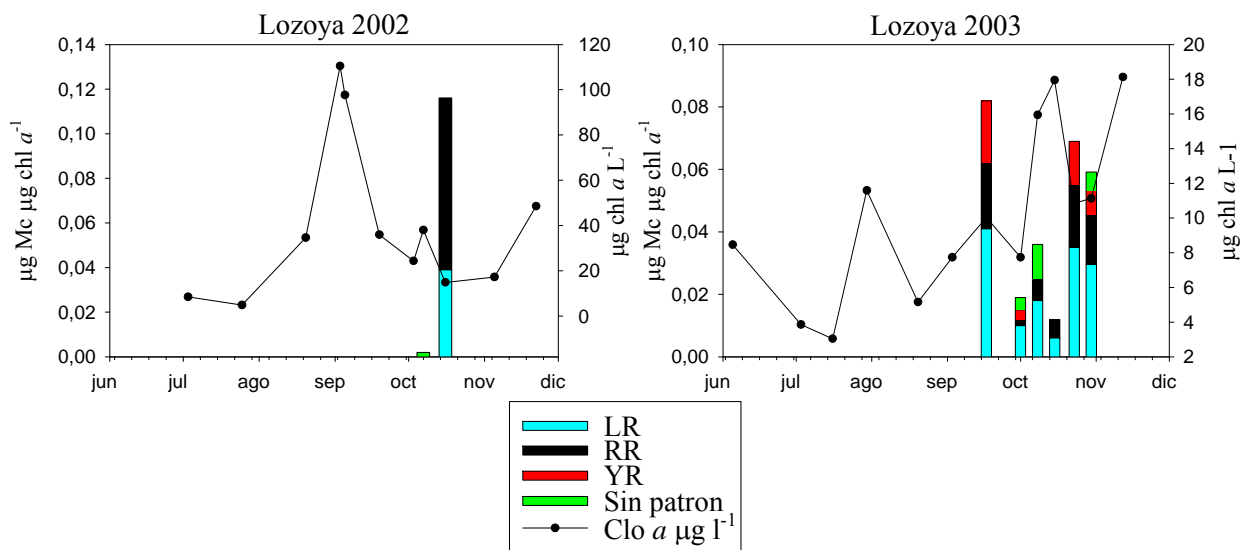


Figura II.11. Presencia de microcistinas fracción concentrada por red en 2002 y 2003 en el embalse de Lozoya. Relación microcistina-clorofila de los diferentes tipos de microcistinas cuando estuvieron presentes (barras). Las microcistinas de las cual no se tiene patrón se calcularon como equivalentes de Mc-LR y se sumaron. En líneas se muestra la concentración de clorofila en la fracción sestónica (Para más información ver el capítulo I).

Fecha de muestreo	[Mc] $\mu\text{g L}^{-1}$	Relación $\mu\text{g Mc } \mu\text{g clo } a^{-1}$	[Mc LR] $\mu\text{g L}^{-1}$	[Mc RR] $\mu\text{g L}^{-1}$	[Mc YR] $\mu\text{g L}^{-1}$
3-10-02	0,075	0,0031	0,075	0	0
5-11-02	0,078	0,0058	0	0,078	0
15-10-03	0,257	0,013	0,257	0	0
23-10-03	0,158	0,014	0,158	0	0

Tabla II.3. Concentración y tipos de microcistinas detectadas en el embalse de Lozoya.

Cuando analizamos los resultados de las muestras concentradas por red en las que se detectaron microcistinas, únicamente en uno de los muestreos (el del 5-11-2002) se observa una incongruencia con las muestras no concentradas, puesto que estas se detectaron en la fracción no concentrada y sin que estas aparecieran en la muestra concentrada por la red de



fitoplancton. Si comparamos los valores obtenidos en los dos tipos de muestras observamos que en todos ellos la relación $Mc (Clo a)^{-1}$ fue inferior en el caso de las muestras no concentradas que en las concentradas. Los valores encontrados muestran además que los valores más elevados de la relación $Mc Clo a^{-1}$ no se obtuvieron en los picos de biomasa, con lo que no coinciden los picos de clorofila con los valores más elevados de la relación $Mc clo a^{-1}$.

Respecto a las concentraciones de microcistinas encontradas en las muestras no concentradas, solo en dos ocasiones en cada uno de los años fue posible detectar. Cuando analizamos las concentraciones y tipos de toxinas que presentaron observamos, que las concentraciones nunca superaron los $0,3 \mu g L^{-1}$ y que los valores de la relación toxina/clorofila indican que las poblaciones de algas presentes en este embalse presentaron una baja capacidad toxica, como también muestra la $Mc clo a^{-1}$ de las muestras concentradas por red.

En cuanto a las especies químicas de microcistinas que estuvieron presentes, podemos ver, por un lado que la microcistina LR fue la especie química más común tanto en el 2002, como en el año 2003 y que en el caso de las muestras concentradas por red normalmente representó más del 50% de la microcistina presente. El segundo tipo de microcistina más importante fue la microcistina RR que normalmente presentó una concentración menor.

4.3.2. Presencia de microcistinas en el embalse de Río Sequillo.

En el embalse de Río Sequillo como en el caso anterior se puede observar que el año 2003 fue el que presentó mayor número de episodios tóxicos. En este año fue posible detectar microcistinas en todos los muestreos salvo en el primero (junio) en las muestras concentradas por red, alcanzando el máximo en los meses de septiembre y octubre (Figura II.12). Además de las diferencias en el número de muestras positivas, las diferencias entre ambos años en las relaciones $Mc/Clo a$ fueron de dos ordenes de magnitud, esto indicaría que la potencialidad tóxica de las cianobacterias presentes fue muy diferente entre los dos años (como podemos



observar en el capítulo I. El año 2003 se caracterizó por presentar a *M. aeruginosa* como especie dominante. Por otro lado las bajas concentraciones de clorofila obtenidas en este embalse en los dos años de estudio, especialmente en el 2003, hizo que en sólo una ocasión en cada uno de los dos años, en los mes de octubre (en el año 2002) y noviembre (en el año 2003), fuera posible detectar microcistinas en las muestras no concentradas, sin superar en ninguno de los dos casos el valor de $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tabla II.4).

Respecto a cuales fueron las tipos químicos de microcistina presentes podemos observar que cuando las concentraciones son bajas únicamente aparecio Mc-LR, mientras que cuando las concentraciones aumentaron aparecieron también otras variantes, primero MC-YR y posteriormente MC-RR.

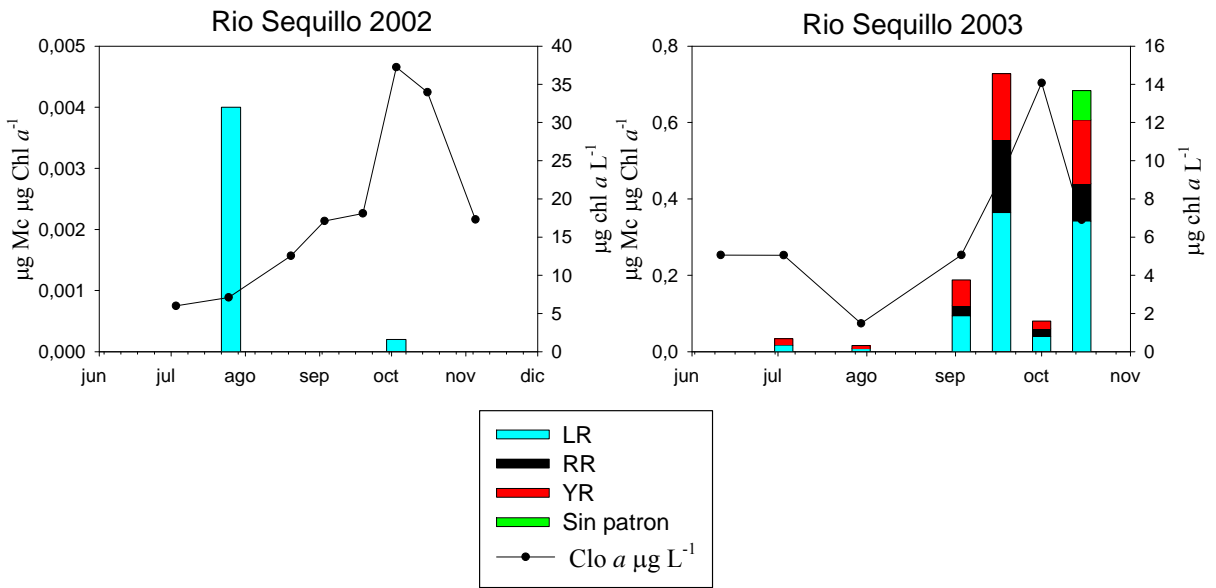


Figura II.12. Presencia de microcistinas fracción concentrada por red en 2002 y 2003 en el embalse de Río Sequillo Relación microcistina-clorofila de los diferentes tipos de microcistinas cuando estuvieron presentes (barras). Las microcistinas de las cual no se tiene patrón se calcularon como equivalentes de Mc-LR y se sumaron. En líneas se muestra la concentración de clorofila en la fracción sestónica (Para más información ver el capítulo I).

Fecha de	[Mc]	Relación	[Mc LR]	[Mc RR]	[Mc YR]
----------	------	----------	---------	---------	---------



muestreo	$\mu\text{g L}^{-1}$	$\mu\text{g Mc } \mu\text{g clo } a^{-1}$	$\mu\text{g L}^{-1}$	$\mu\text{g L}^{-1}$	$\mu\text{g L}^{-1}$
5-11-02	0,021	0,0015	0,021	0	0
15-10-03	0,068	0,01	0,068	0	0

Tabla II.4. Concentración y tipos de microcistinas detectadas en el embalse de Río Sequillo.

4.3.3. Presencia de microcistinas el embalse de El Vellón.

En el embalse de El Vellón, el número de muestras que presentaron microcistinas fue similar en ambos años, en siete ocasiones en 2002 y en cinco en 2003 (Figura II.13). En cambio, sí existen diferencias tanto en la relación $\text{Mc Clo } a^{-1}$ que fue mayor en el 2003 como en el momento en que aparecieron las microcistinas. Éstas aparecieron entre julio y septiembre en el 2002 y entre septiembre y octubre en 2003, este cambio en el patrón de aparición no había ocurrido en ninguno de los dos embalses anteriores. También y en paralelo a este cambio temporal, existe un cambio en los tipos químicos de microcistinas encontradas, en 2002 la toxina mayoritaria fue la Mc-LR , siguiéndola en importancia la microcistina YR . En 2003, la toxina mayoritaria fue la microcistina RR , existiendo en general una mayor diversidad en los tipos químicos de microcistinas detectadas. Respecto a las microcistinas en la fracción sestónica no concentrada, únicamente se detectaron microcistinas en dos ocasiones en el año 2003. Las concentraciones pueden considerarse medias, alrededor de $0,3 \mu\text{g Mc L}^{-1}$ similares a las encontradas en el embalse de Lozoya en ese mismo año. La toxina mayoritaria detectada en los dos casos fue la microcistina LR , si bien en una de las ocasiones también fue posible detectar la microcistina RR (Tabla II.5).

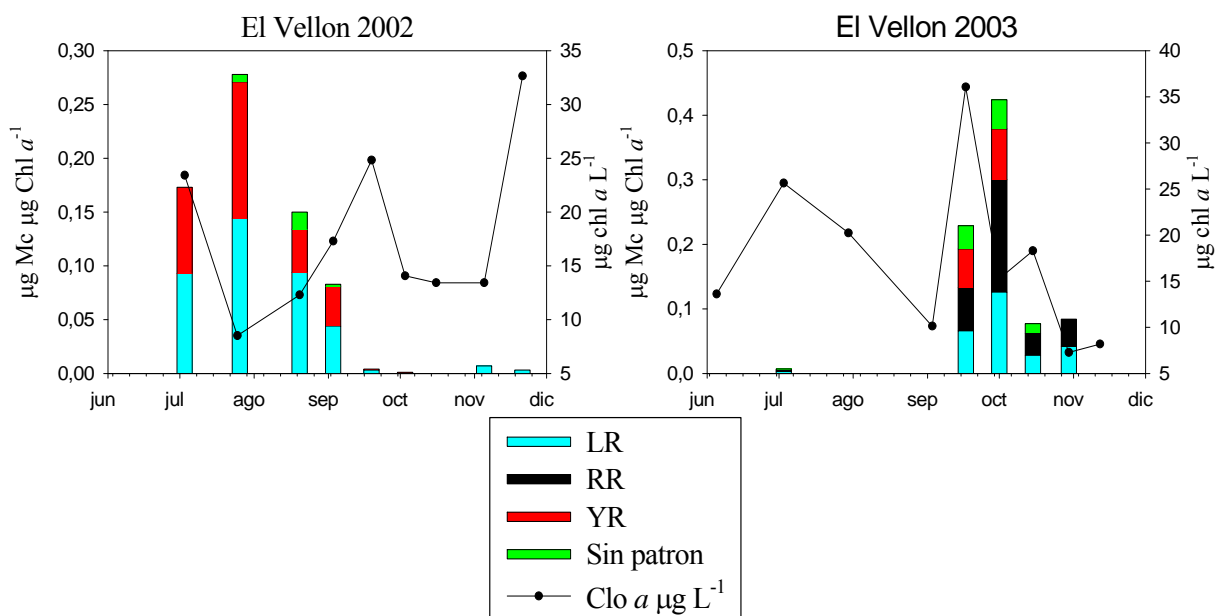


Figura II.13. Presencia de microcistinas fracción concentrada por red en 2002 y 2003 en el embalse de El Vellón. Relación microcistina-clorofila de los diferentes tipos de microcistinas cuando estuvieron presentes (barras). Las microcistinas de las cual no se tiene patrón se calcularon como equivalentes de Mc-LR y se sumaron. En líneas se muestra la concentración de clorofila en la fracción sestónica (Para más información ver el capítulo I).

Fecha de muestreo	[Mc] $\mu\text{g L}^{-1}$	Relación $\mu\text{g Mc } \mu\text{g clo } a^{-1}$	[Mc LR] $\mu\text{g L}^{-1}$	[Mc RR] $\mu\text{g L}^{-1}$	[Mc YR] $\mu\text{g L}^{-1}$
1-10-03	0,209	0,0134	0,125	0,083	0
15-10-03	0,341	0,0191	0,341	0	0

Tabla II.5. Concentración y tipos de microcistinas detectadas en el embalse de El Vellón.



4.3.4. Presencia de microcistinas en el embalse de Santillana.

En el embalse de Santillana se detectaron altas concentraciones de microcistinas de manera recurrente en los dos años objeto de estudio. De hecho en las muestras concentradas por red pudo detectarse toxina en todos los muestreos realizados excepto en uno (Figura II.15). Cuando analizamos el patrón de aparición observamos que los máximos, como ocurrió en el embalse de El Vellón, tuvieron lugar en momentos distintos. En el año 2002 las máximas concentraciones se detectaron entre los meses de septiembre y noviembre y en el año 2003 entre junio y septiembre (Figura II.14, Figura II.15). Este fue el embalse en el que se detectaron las mayores concentraciones de microcistinas en la Comunidad de Madrid, alcanzándose en la fracción concentrada por red relaciones $\text{Mc clo } a^{-1}$ superiores a 2 y en la fracción sestónica no concentrada valores superiores a $1 \mu\text{g Mc L}^{-1}$ durante varios meses, con máximos superiores a $40 \mu\text{g Mc L}^{-1}$.

Analizando más en profundidad la variación espacio-temporal que presentan las concentraciones de microcistinas podemos observar, por un lado que, en general, existen grandes diferencias en la concentración que presentan puntos opuestos del embalse como podemos observar por las barras de error de la Figura II.15. Por otro lado que en periodos de una semana las concentraciones en un mismo punto pueden cambiar bruscamente pasando de más de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, a estar por debajo del límite de detección y viceversa. También podemos observar que las concentraciones de microcistinas mayores no se alcanzan simultáneamente a las concentraciones máximas de clorofila, algo que hemos observado en los otros embalses.

Los valores máximos obtenidos en las muestras no concentradas fueron similares en los dos años con una media en el embalse (considerado dos puntos en orillas opuestas) superior a $40 \mu\text{g Mc L}^{-1}$ y también la extensión temporal (tiempo que la toxina pudo detectarse), en el caso del año 2003 se pudieron detectar microcistinas durante cuatro meses, mientras que en 2002 la extensión de tiempo fue de tres meses.

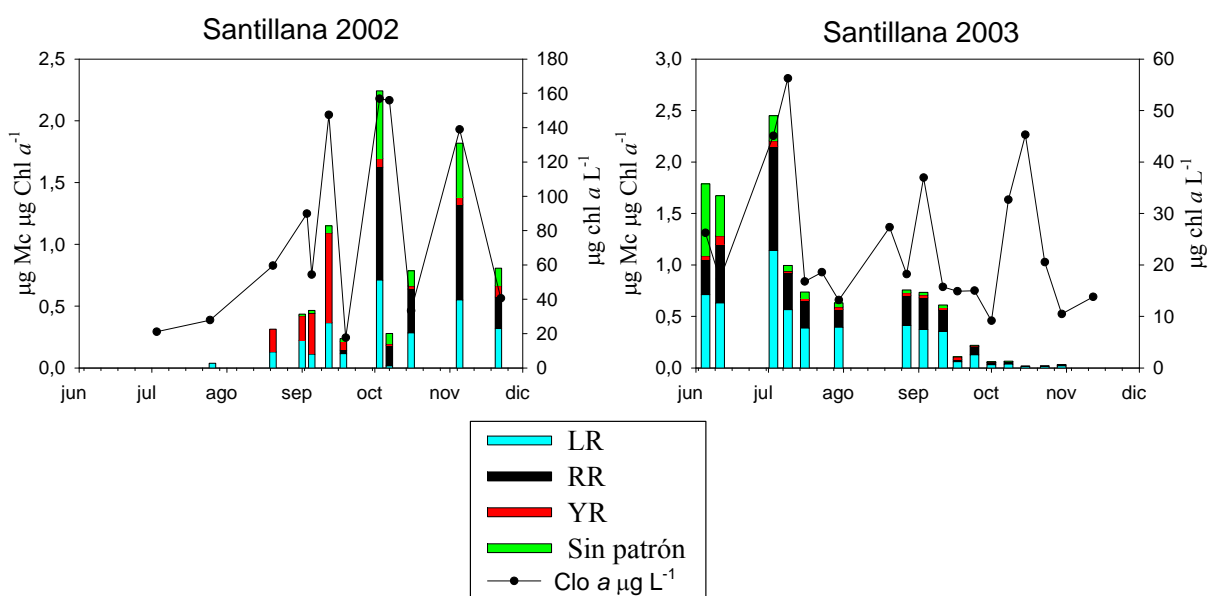


Figura II.14. Presencia de microcistinas fracción concentrada por red en 2002 y 2003 en el embalse de Santillana. Relación microcistina-clorofila de los diferentes tipos de microcistinas cuando estuvieron presentes (barras). Las microcistinas de las cual no se tiene patrón se calcularon como equivalentes de Mc-LR y se sumaron. En líneas se muestra la concentración de clorofila en la fracción sestónica (Para más información ver el capítulo I).

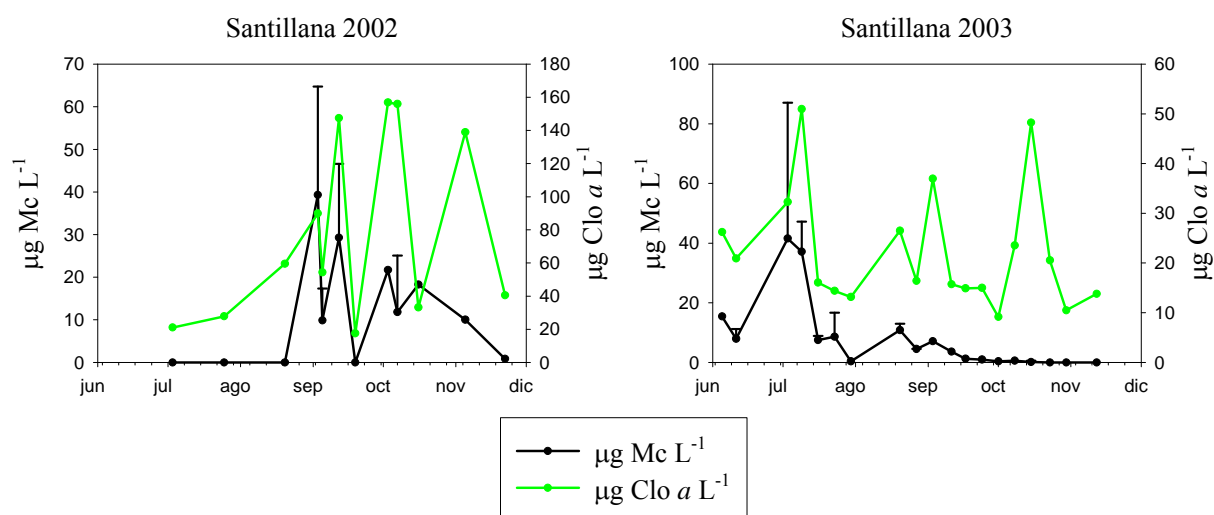


Figura II.15. Concentración de microcistinas y clorofila en la fracción no concentrada por en el embalse de Santillana. Las barras de error indican la desviación estándar en los momentos en las que se analizaron la concentración de microcistinas en dos puntos separados del embalse.



Cuando comparamos los datos de la relación clorofila/toxina de la fracción concentrada por red (Figura II.14) y no concentrada (Figura II.16), podemos ver que durante los momentos en que la concentración de microcistinas superó el $1 \mu\text{g Mc L}^{-1}$ la relación $\text{Mc/Clo } a$ en las muestras no concentradas por red fueron siempre cercanas o superiores a $0,1 \mu\text{g Mc L}^{-1}$ en esa misma fracción, es decir que únicamente son necesarios $10 \mu\text{g}$ clorofila para que se supere el valor guía propuesto por la OMS. Es interesante también comparar la concentración de clorofila que presentaron los dos años analizados y las concentraciones de microcistinas que se alcanzaron en cada uno de ellos, como podemos ver la relación $\text{Mc/Clo } a$ muestra valores en el año 2003 casi dos veces superiores a los encontrados en el 2002, diferencia que se mantuvo durante los momentos en los que la concentración de microcistinas fue elevada. Esta gran diferencia entre los dos años indican que los organismos presentes en el año 2003 fueron más tóxicos que los encontrados en el 2002, al menos cuando se utiliza la clorofila a como valor de biomasa.

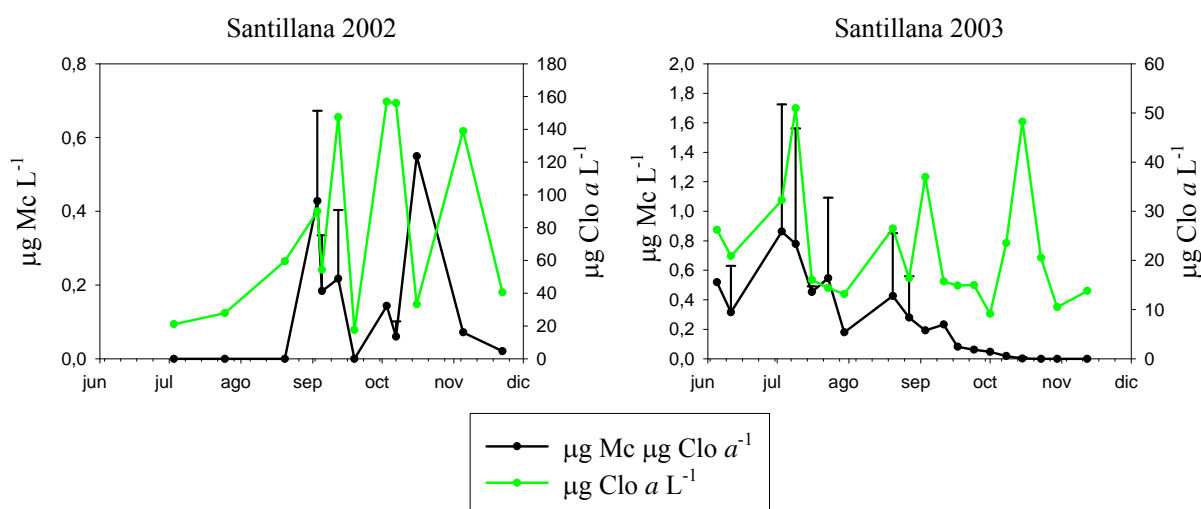


Figura II.16. Relación microcistinas/clorofila y clorofila en las muestras no concentradas por red en el embalse de Santillana. Las barras de error indican la desviación estándar en los momentos en las que se analizaron la concentración de microcistinas en dos puntos separados del embalse.

Cuando analizamos las tendencias que presentaron los tipos de químicos de microcistinas presentes tanto en la fracción concentrada por red (Figura II.14), como en la no



concentrada (Figura II.17), observamos que en los puntos con mayor concentración de microcistinas el tipo de toxinas presentes fue similar, encontrando por un lado el grupo de toxinas comunes (LR, RR e YR) casi durante todo el periodo de muestreo en la fracción concentrada por red y generalmente dos de ellas en la no concentrada. Y otro grupo formado por el resto de toxinas que en general, sólo se detectaron cuando las concentraciones de microcistina total fueron elevadas. Analizando más en profundidad las diferencias entre los diferentes tipos de microcistinas, observamos que las variantes que se detectaron tenemos que el tipo LR fue detectado en 24 ocasiones (100% de las muestras que presentaron este tipo de compuestos), el RR detectada en 20 (83%) y el YR en 15 (63%). Dentro del segundo grupo, las microcistinas para las cuales no existía patrón en total se detectaron, en total en 11 ocasiones y en proporciones muy similares en los dos años (5 de 8 en 2002 y 7 de 16 en 2003), aunque esta similitud desaparece cuando analizamos el número de toxinas diferentes que aparecieron, en el 2003 se presentaron como media $3,43 \pm 0,98$ toxinas diferentes en cada ocasión, mientras que en el año 2002 el número fue inferior de $1,33 \pm 0,82$, esto indica que la población en el año 2003 presentó una mayor diversidad en cuanto a producción de microcistinas se refiere.

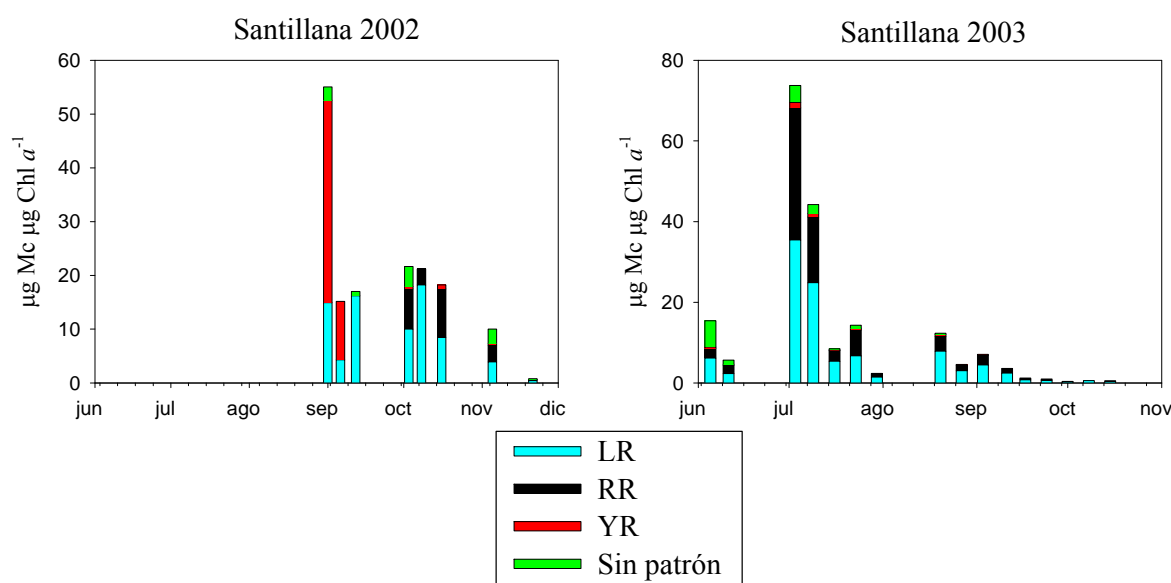


Figura II.17. Concentración de los diferentes tipos de microcistinas las muestras no concentradas por red con en el embalse de Santillana. Se muestra sólo los tipos de microcistinas presentes en el punto donde se determinó mayor concentración de microcistinas.



Dentro de las toxinas analizadas la microcistina LR no sólo fue la microcistina que apareció en un mayor número de ocasiones, sino que además en general representó la mayor parte de la microcistina total detectada, como media casi el 60% de la microcistina total (Tabla II.6). La microcistina RR fue la siguiente en importancia en cuanto a porcentaje del total, representando el 27% de la microcistina total y finalmente dentro de las comunes fue la microcistina YR la que tuvo una menor importancia con un 7%. Este valor de la microcistina YR fue similar al que mostró en conjunto el de resto de microcistinas.

Tipo de Mc	% sobre el total \pm SD
LR	59% \pm 19%
RR	27 \pm 15
YR	7 \pm 19
Otras	7 \pm 11

Tabla II.6. Porcentaje de las diferentes microcistinas sobre el total. Media \pm SD (n = 24).

4.3.5. Presencia de microcistinas en el embalse de Valmayor

El embalse de Valmayor fue especialmente diverso en lo que se refiere a la proporción de muestras que presentaron microcistinas, mientras en el año 2002 únicamente fue posible detectar microcistinas en dos muestras concentradas por red, en 2003 el número de muestreos en las que se detectaron microcistinas fue muchísimo mayor (10) (Figura II.18). En lo que se refiere a las concentraciones de toxina, en el 2002 el máximo fue de $0,7 \mu\text{g Mc } \mu\text{g Clo } a^{-1}$ y en el 2003 llegó a ser de más del doble (1,57) y fue posible detectar este tipo de compuestos durante un periodo superior a 3 meses, a pesar de presentar concentraciones de clorofila inferiores a las encontradas en el año 2002. Cabe destacar la muestra que apareció en julio del 2002 que mostró una gran diversidad de microcistinas con más de 15 especies químicas



diferentes que no se pudieron identificar en su totalidad por la ausencia de patrones. En 2003 la microcistinas mayoritarias fueron la Mc-LR, mientras con respecto a la segunda toxina en importancia, en la primera parte del periodo tóxico fue la Mc-YR y en la segunda la Mc-RR.

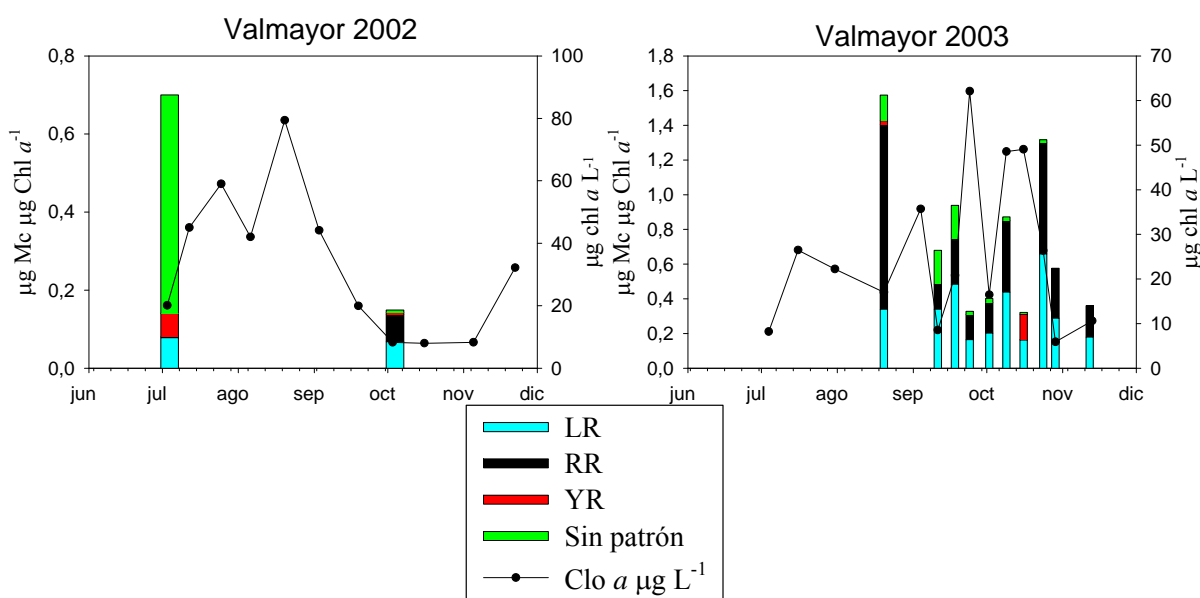


Figura II.18. Presencia de microcistinas fracción concentrada por red en 2002 y 2003 en el embalse de Valmayor. Relación microcistina-clorofila de los diferentes tipos de microcistinas cuando estuvieron presentes (barras). Las microcistinas de las cual no se tiene patrón se calcularon como equivalentes de Mc-LR y se sumaron. En líneas se muestra la concentración de clorofila en la fracción sestónica (Para más información ver el capítulo I).

En el caso de las muestras no concentradas, el embalse de Valmayor presentó microcistinas también en los dos años, pero mientras que en el 2002 presentó toxinas en una sola ocasión y presentado concentraciones inferiores a $0,03 \mu\text{g Mc L}^{-1}$ y una baja relación Mc/Clo *a*, de 0,0026 (Tabla II.7), en el año 2003 este tipo de compuestos se detectaron en concentraciones moderadas y continuadas entre los meses de septiembre y noviembre (Figura II.20).



Fecha de muestreo	[Mc] $\mu\text{g L}^{-1}$	Relación $\mu\text{g Mc } \mu\text{g clo } a^{-1}$	[Mc LR] $\mu\text{g L}^{-1}$	[Mc RR] $\mu\text{g L}^{-1}$	[Mc YR] $\mu\text{g L}^{-1}$
4-10-02	0,026	0,0027	0,026	0	0

Tabla II.7. Concentración y tipos de microcistinas detectadas en el año 2002 en el embalse de Valmayor.

En el año 2003 como hemos indicado en el párrafo anterior fue posible detectar microcistinas durante los tres últimos meses de muestreo y en tres momentos puntuales las concentraciones medias en el embalse fueron superiores a $1 \mu\text{g Mc L}^{-1}$ (Figura II.19), alcanzándose un valor máximo cinco veces superior a este valor. De nuevo como en el caso en el embalse de Santillana los valores mayores se alcanzaron justo antes de que la biomasa expresada como clorofila *a* alcanzase su valor máximo, esto se puede observar mucho mejor cuando representamos la relación entre clorofila *a* y microcistinas, donde podemos observar una brusca disminución justo después de alcanzar el máximo.

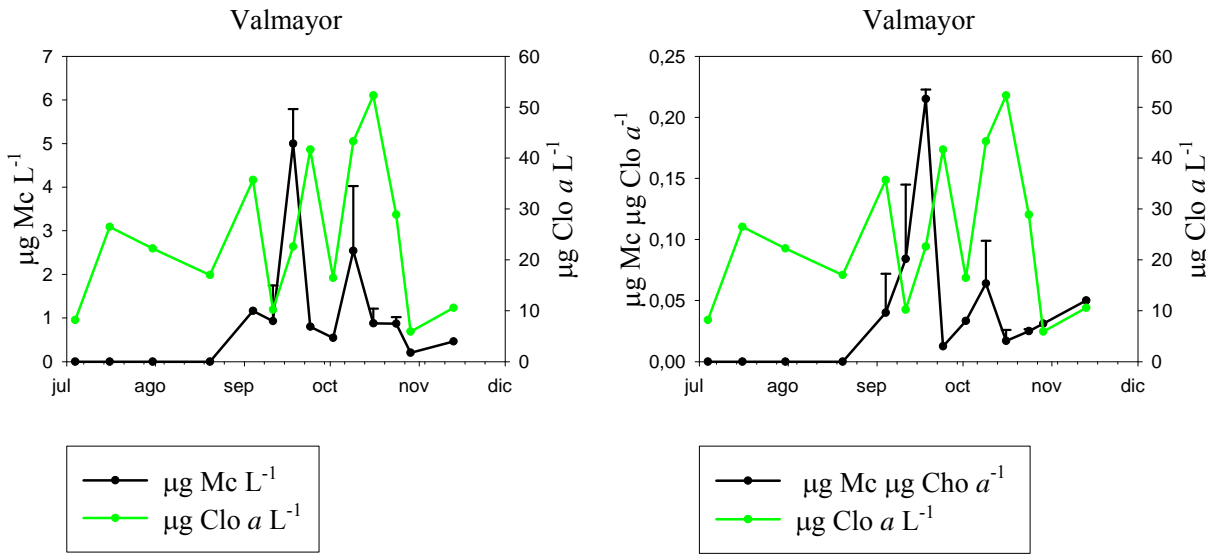


Figura II.19. Concentración de microcistinas, relación Mc/Clo *a* y clorofila en las muestras no concentradas por red en el embalse de Valmayor en el año 2003. Las barras de error indican la desviación estándar en los momentos en las que se analizaron la concentración de microcistinas en dos puntos separados del embalse. El 24 de septiembre se analizaron dos puntos de muestreo, pero sólo se detectaron microcistinas en uno de ellos, el valor que se representa en esa ocasión es el del punto donde se detectaron



En cuanto a los tipos de microcistinas observados en el embalse de Valmayor, se observa una menor diversidad respecto a la encontrada en el embalse de Santillana, como máximo se encontraron sólo dos variantes de microcistinas. En todos los casos una de ellas fue MC-LR y en el 33% de las muestras se encontró también microcistina YR (5 muestras de 15 totales) Figura II.20. Cuando analizamos la importancia tienen estas toxinas respecto al total, podemos ver dos partes diferenciadas, en una primera parte la microcistina YR es la toxina mayoritaria, para posteriormente, después de una brusca caída en la concentración, sufrir un cambio pasando a ser la microcistina LR la toxina mayoritaria. Cabe destacar que esta segunda parte representa la mayor parte de las muestras que presentaron microcistinas, si bien las concentraciones alcanzadas fueron menores.

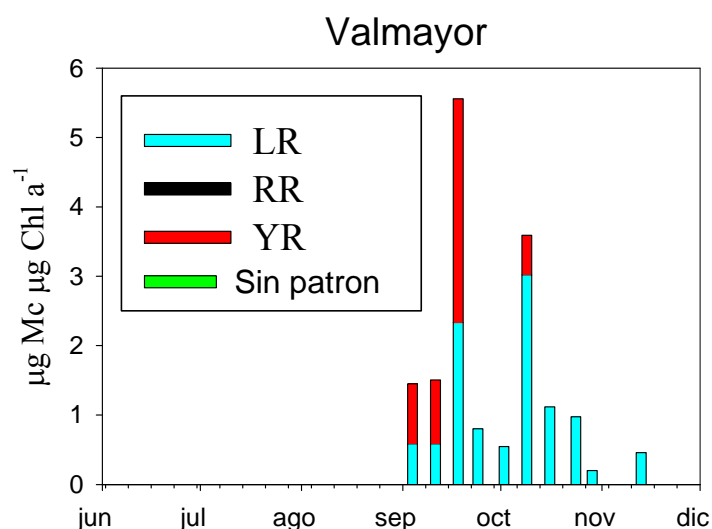


Figura II.20. Concentración de los diferentes tipos de microcistinas las muestras no concentradas por red en el embalse de Valmayor en el año 2003. Se muestra sólo los tipos de microcistinas presentes en el punto donde se determinó mayor concentración de microcistinas.

4.3.6. Presencia de microcistinas en el embalse de San Juan.

En el embalse de San Juan se pudieron detectar microcistinas en las muestras de red en ambos años estudiados (Figura II.21), si bien el máximo detectado en 2003 fue más de dos



veces superior al encontrado en 2002, pero en la fracción no concentrada únicamente se detectaron en una ocasión en el año 2003 coincidiendo además con una muestra en la que no fue posible detectar microcistinas en la muestra concentrada de red, la concentración alcanzada presentó una concentración superior a $3 \mu\text{g Mc L}^{-1}$. Las dos toxinas mayoritarias que pudieron detectarse fueron la microcistina RR y la LR, siendo en este caso la microcistina RR la mayoritaria.

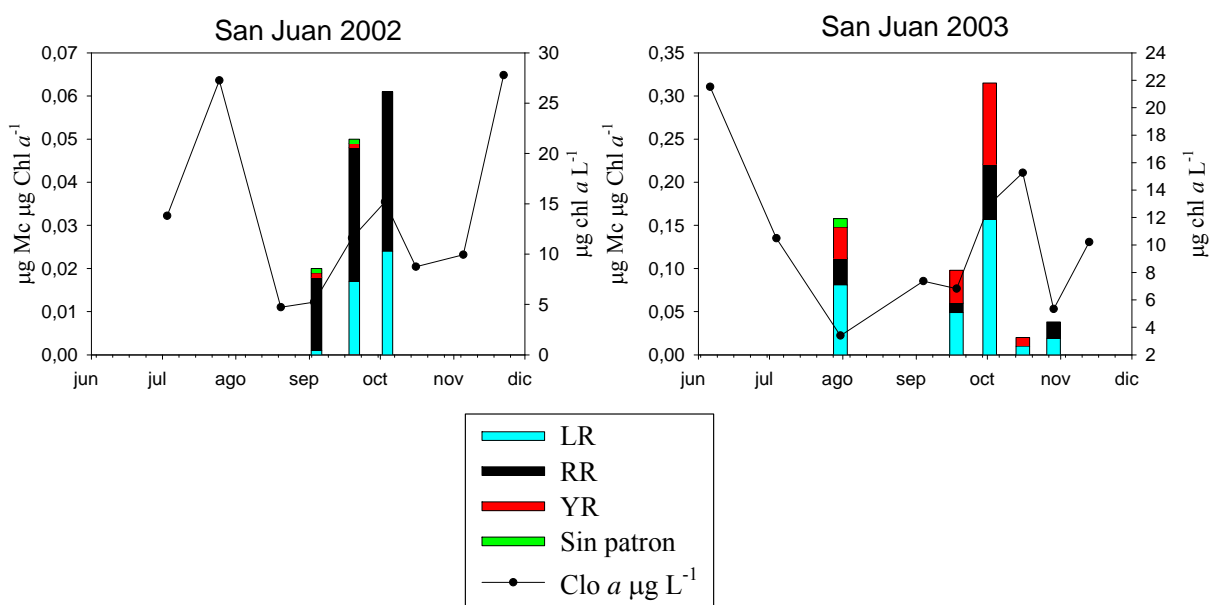


Figura II.21. Presencia de microcistinas fracción concentrada por red en 2002 y 2003 en el embalse de San Juan. Relación microcistina-clorofila de los diferentes tipos de microcistinas cuando estuvieron presentes (barras). Las microcistinas de las cual no se tiene patrón se calcularon como equivalentes de Mc-LR y se sumaron. En líneas se muestra la concentración de clorofila en la fracción sestónica (Para más información ver el capítulo I).

Fecha de muestreo	[Mc] $\mu\text{g L}^{-1}$	Relación $\mu\text{g Mc } \mu\text{g clo } a^{-1}$	[Mc LR] $\mu\text{g L}^{-1}$	[Mc RR] $\mu\text{g L}^{-1}$	[Mc YR] $\mu\text{g L}^{-1}$
4-9-03	3,12	0,435	1,37	1,72	0

Tabla II.10. Concentración y tipos de microcistinas detectadas en el embalse de Río Sequillo.



4.3.7. Presencia de microcistinas en el embalse de Picadas.

En el embalse de Picadas fue posible detectar microcistinas en un elevado porcentaje de los muestreos (el 65%) (Figura II.22), pero sólo en 2003 fue posible detectar microcistinas en la fracción no concentrada. Cuando comparamos la relación $\text{Mc Clo } a^{-1}$ en las muestras concentradas por red encontradas en los dos años observamos valores similares, de alrededor de $0,05 \mu\text{g Mc } \mu\text{g clo } a^{-1}$, salvo en un momento puntual en 2003 que presentó un valor 6 veces superior al resto. El patrón de presencia fue similar en ambos años con la mayor parte de las muestras positivas en los meses de septiembre y octubre. En cuanto a la presencia de toxinas en las muestras no concentradas sólo el año 2003 mostró concentraciones detectables de este tipo de compuestos.

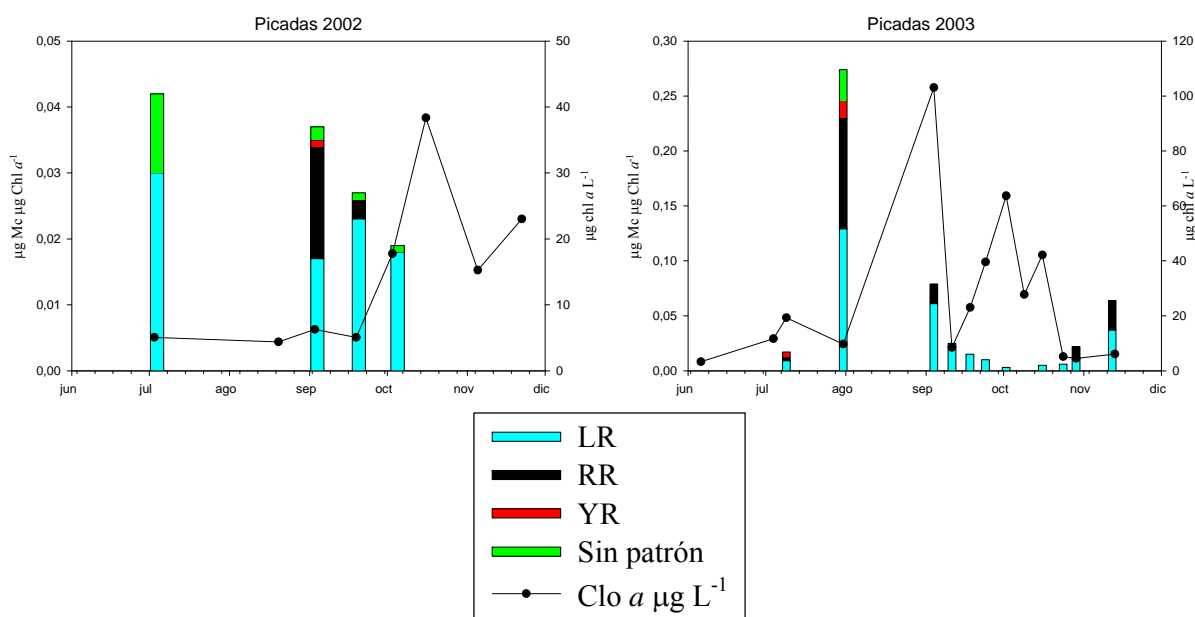


Figura II.22. Presencia de microcistinas fracción concentrada por red en 2002 y 2003 en el embalse de Picadas. Relación microcistina-clorofila de los diferentes tipos de microcistinas cuando estuvieron presentes (barras). Las microcistinas de las cual no se tiene patrón se calcularon como equivalentes de Mc-LR y se sumaron. En líneas se muestra la concentración de clorofila en la fracción sestónica (Para más información ver el capítulo I).



Analizando más en profundidad la presencia de microcistinas en las muestras no concentradas durante el año 2003 observamos que estas aparecieron de manera recurrente durante los meses de septiembre y octubre (Figura II.23), encontrado el máximo justo a principios de septiembre. Cabe destacar que en ese momento sólo fue posible detectar la presencia de microcistinas en el punto secundario (para mas información ver capítulo I). La concentración que en ese momento se alcanzó fue ligeramente superior a $1 \mu\text{g Mc L}^{-1}$. Posteriormente la se observa una brusca disminución para posteriormente estabilizarse en valores alrededor de $0,3 \mu\text{g Mc L}^{-1}$, para finalmente detectarse de nuevo en un único punto de muestreo, en este caso en el punto principal el más cercano al muro de la presa. Esto indicaría un posible desplazamiento del organismo productor desde la cola del embalse a la cabecera.

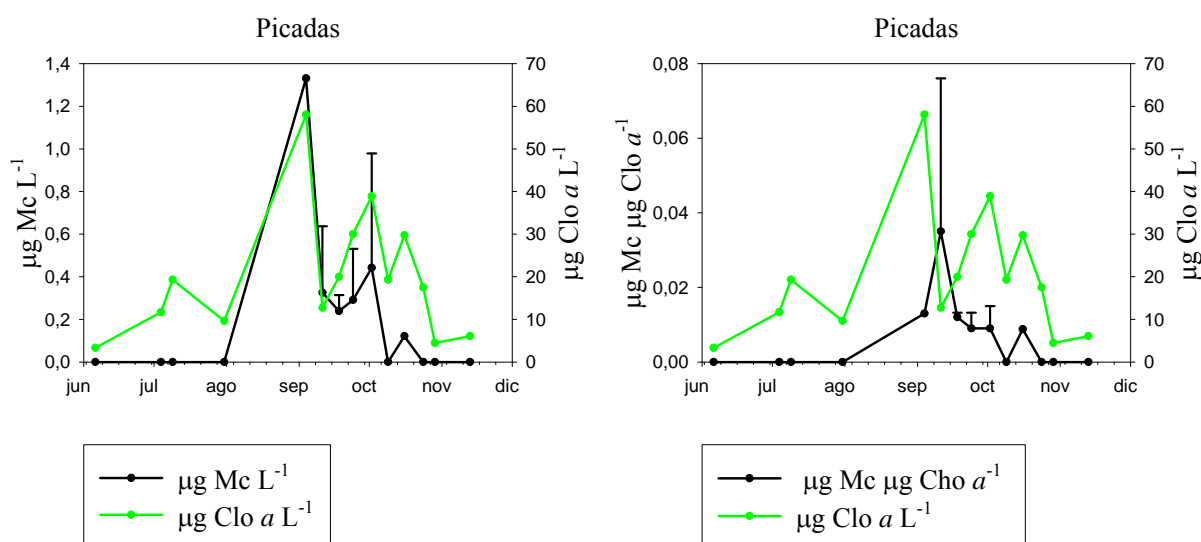


Figura II.23. Concentración de microcistinas, relación Mc/Clo a y clorofila en las muestras no concentradas por red en el embalse de Picadas en el año 2003. Las barras de error indican la desviación estándar en los momentos en las que se analizaron la concentración de microcistinas en dos puntos separados del embalse. Desde principios de septiembre a 15 de octubre se analizaron dos puntos diferentes del embalse, en los cuando en esas fechas no se muestra barra de error porque o no se detectaron microcistinas o únicamente se detectaron en uno de los puntos de muestreo.

Cuando analizamos como se modifica la relación Mc/Clo a a lo largo de este periodo, podemos observar que la relación presentó valores muy bajos (inferiores a 0,08), lejanos de los que se encontraron en los embalses que también presentaron este tipo de toxinas de manera



recurrente en las muestras no concentrada (Santillana y Valmayor). Respecto al tipo químico de microcistinas encontradas en todas las muestras apareció la variante LR y solamente en la primera de las muestras presentaron la variante RR, representado menos del 20% de la microcistinas total.

4.3.8. Variantes químicas de microcistinas en todos los embalses.

Cuando analizamos las los tipos de microcistinas en los siete embalses en conjunto en los dos tipos de muestras se observa una mayor cantidad de variantes químicas en las muestras concentradas por red (Tabla II.11) que en las muestras no concentradas (Tabla II.12). De todas maneras las tres microcistinas que fueron las más comunes, la microcistina LR, RR e YR, se encontraron en mas del 50% de las muestras concentradas por red en las que se detectaron este tipo de compuestos, aunque otras 6 estuvieron presentes en al menos el 20 % en alguno de los dos años muestreados en las muestras concentradas por red (las únicas representadas en la Tabla II.11) y sólo tres de ellas se presentaron en menos de este 20% en los dos años muestreados (datos no mostrados).

Tipo de Mc	2002	2003
LR	90 %	96 %
RR	52 %	66 %
YR	59 %	55 %
WR	24 %	6 %
RT = 14,7	34 %	5 %
RT = 15,7	34 %	20 %
RT = 17,2	24 %	0 %
RT = 19,5	28 %	20 %
RT =20	0 %	24 %

Tabla II.11. Porcentaje de las muestras concentradas por red en los que se detectaron los diferentes tipos químicos de microcistinas. Los tipos de microcistinas



indicadas son aquellas que se detectaron en un 20% de las muestras o superior. Aquellas microcistinas que no fueron identificadas se denominaron por su tiempo de retención (RT).

Los datos indican claramente que las microcistinas más comunes fueron la LR, RR e YR, cabe destacar que la microcistina LR (la que presenta una toxicidad mayor en ratón $DL_{50} = 50 \mu\text{g kg}^{-1}$) estuvo presente en más del 90% de las muestras concentradas por red, mientras que las otras dos toxinas mayoritarias se encontraron en valores muy similares, ligeramente superiores al 50% de las muestras en las que se detectó este tipo de toxinas en caso de las muestras concentradas por y del 63% y 37% respectivamente en el caso de las muestras no concentradas (Tabla II.12).

Tipo de Mc	2002	2003	Total
LR	94	100	99
RR	44	69	63
YR	39	36	37
RT = 12,9	28	5	11
RT = 15,7	0	20	15
RT = 17,2	22	0	5

Tabla II.12. Porcentaje de las muestras no concentradas por red en los que se detectaron los diferentes tipos químicos de microcistinas. Los tipos de microcistinas indicadas son aquellas que se detectaron en un 20% de las muestras o superior. Aquellas microcistinas que no fueron identificadas se denominaron por su tiempo de retención (RT).

Respecto al resto de microcistinas, que no fue posible identificar al carecer de patrones, Hay que estacar que la mayor parte aparecieron durante los momentos de bloom y las que presentaron los mayores porcentajes se detectaron sobre todo, o exclusivamente en el embalse de Santillana, especialmente en la caso de las muestras no concentradas. De hecho todas ellas se detectaron en los momentos de mayor concentración de las microcistinas identificadas en el embalse de Santillana, mientras que en el resto de embalses salvo de manera puntual en Valmayor no se encontraron variantes de microcistinas diferentes a las tres mayoritarias. Ésto es especialmente importante en el año 2002 donde únicamente se detectó un afloramiento tóxico en el embalse de Santillana y año en que todas la microcistinas “raras”



que representaron más del 10% del total fueron detectadas en ese embalse. Podemos destacar las que encontramos a tiempos de retención 15,7 y 19,5 que poseían un espectro de absorción similar la microcistina LR, que se encontraron de manera repetida en los dos años con porcentajes superiores o iguales al 20%. La microcistina WR pudo ser determinada por espectrometría de masas (datos no mostrados) y fue la única variante con triptófano que pudo detectarse en un número significativo de ocasiones.

4.3.9. Relación entre microcistinas y clorofila.

Se ha analizado si la clorofila se correlacionaba con la concentración de microcistinas encontradas con el fin de ver si era posible utilizar el valor de clorofila presente como indicativo de potencialidad tóxica, tanto en las muestras concentradas por red como en las no concentradas.

Cuando se intenta correlacionar la concentración de clorofila y microcistinas presentes en los extractos de las muestras concentradas se observa una correlación baja ($R^2 = 0,24$, datos no mostrados) aunque mejora perceptiblemente cuando no se consideran los valores que presentaron microcistinas por debajo del límite de detección ($R^2 = 0,46$) (Figura II.24), lo que indica que existe ligera correlación entre estos dos valores.

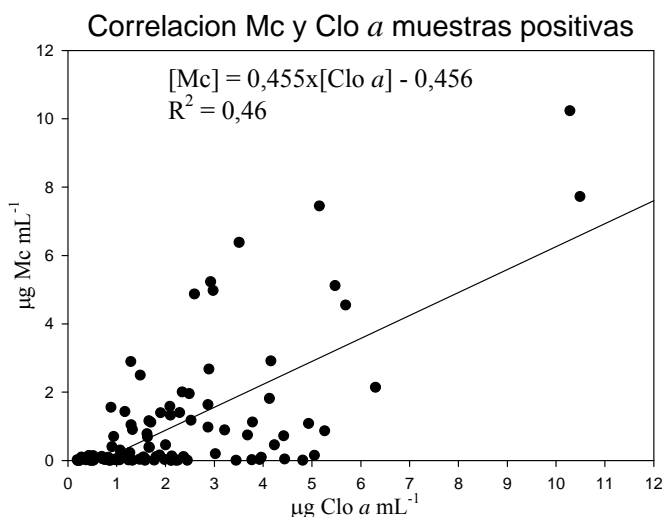


Figura II.24. Correlación entre concentración de clorofila y de Mc en muestras de red. Sólo se incluyeron las muestras que presentaron microcistinas.



Una caso aparte puede considerarse el embalse de Santillana en el cual sí podemos observar una correlación positiva entre concentración de clorofila y microcistinas presentes (Figura II.25). La varianza explicada en este caso es superior al 60%. También podemos observar en estas graficas que numerosas muestras concentradas por red presentaban concentraciones de Mc superiores a las de concentraciones de clorofila muestras especialmente toxicas. Esto ocurrió especialmente en los embalses de Santillana tanto en 2002 como en 2003 (Figura II.14) y en Valmayor en el año 2003 (Figura II.18), cuando se desarrollo un afloramiento de *Microcystis aeruginosa* (para más información ver capítulo1). Cabe destacar que gran parte de las muestras concentradas por red analizadas durante la realización de este trabajo mostraron concentraciones de clorofilas superiores al valor límite establecido de $1 \mu\text{g clo } a \text{ mL}^{-1}$

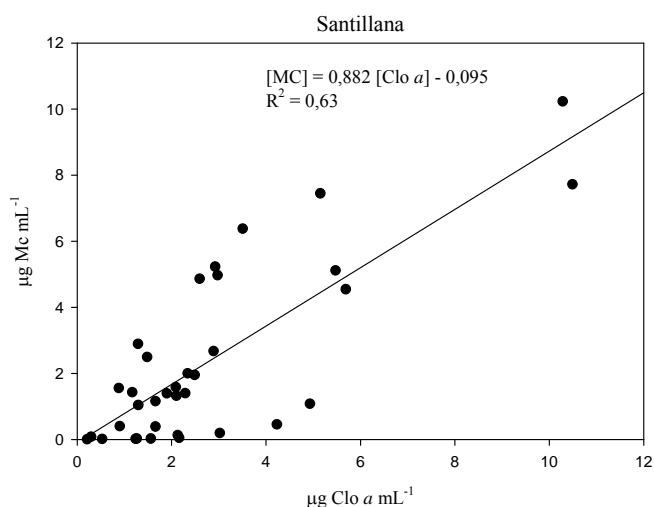


Figura II.25. Correlación entre concentración de clorofila y de Mc en muestras de red en el embalse de Santillana. En al correlación están representados los datos obtenidos en los años 2002 y 2003.

Cuando analizamos si existe correlación entre la concentración de clorofila y la de microcistinas en las distintas muestras no concentradas (Figura II.26) podemos observar que al contrario de lo observado en el caso de las muestras concentradas por red, no aparece ningún tipo de correlación entre la clorofila y la concentración de microcistinas, ni en el total de las



muestras ni cuando únicamente se consideraron las muestras en las cuales se detectó la presencia de este tipo de toxinas. Podemos encontrar tanto muestras que presentaron altas concentraciones de clorofila con bajas o nulas concentraciones de microcistinas, como concentraciones moderadas de clorofila con concentraciones de microcistinas superiores a $60 \mu\text{g Mc L}^{-1}$.

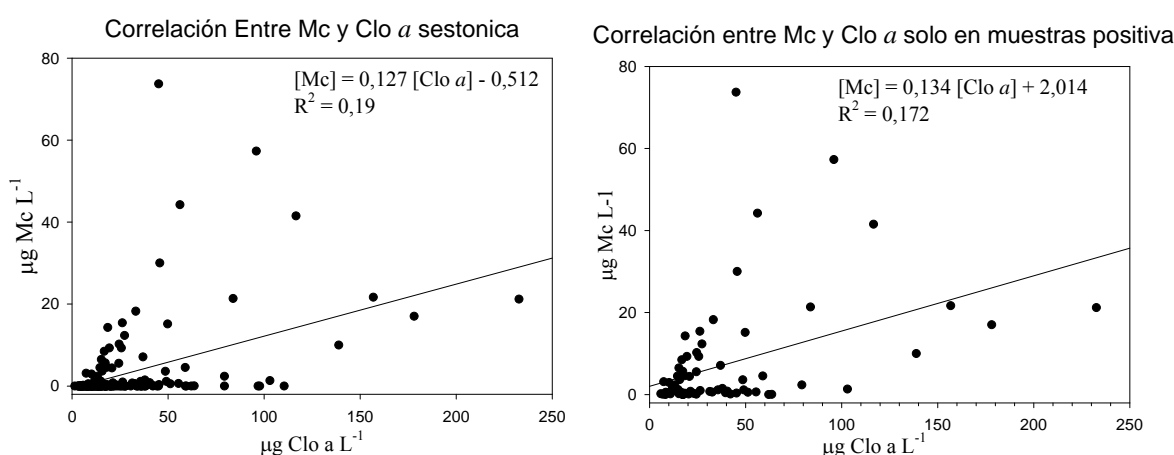


Figura II.26. Correlación entre concentración de clorofila y de Mc en las muestras no concentradas. En la primera figura podemos ver todas las muestras analizadas y en la segunda sólo se incluyeron las muestras que presentaron microcistinas.

En este caso ninguno de los embalses por separado presentó ninguna correlación que mostrara un soporte significativamente mayor a los encontrados cuando todos los datos fueron considerados en conjunto. Por otro lado si ampliamos la grafica que muestra la correlación entre Mc y Clo *a* , (Figura II.27) podemos observar que el valor limite de clorofila a partir del cual podemos observar valores de concentración de microcistinas superiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$, se sitúa por ligeramente por debajo de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorofila *a*.

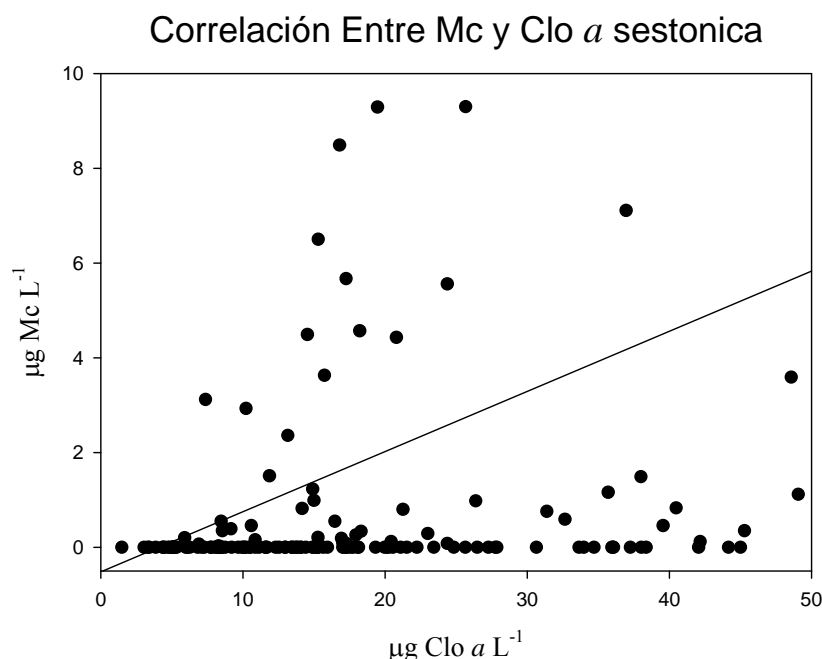


Figura II.27. Detalle de la gráfica que muestra la correlación entre concentración de clorofila y de Mc en las muestras no concentradas. Sólo se muestran los valores bajos de clorofila y microcistinas.

Como hemos indicado en el capítulo I, sólo en el año 2003 fue posible obtener valores de clorofila para los distintos grupos algales con el fluorómetro de todas las muestras analizadas, que son las únicas que se exponen a continuación. La Figura II.28 muestra que tampoco existe correlación entre la clorofila *a* de cianobacterias y la concentración de microcistinas, ni cuando tomamos los datos globales (datos no mostrados), ni cuando consideramos únicamente las muestras que presentaron este tipo de toxinas, lo cual parece indicar que la presencia de cianobacterias no puede utilizarse como indicativo de presencia de este tipo de compuestos. Estas figuras tampoco muestran un valor límite de clorofila *a* de cianobacterias claro a partir del cual podemos encontrar concentraciones moderadas de microcistinas, ya que por ejemplo se han encontrado concentraciones de clorofila *a* de cianobacterias inferiores a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ que presentaban concentraciones de Mc superiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

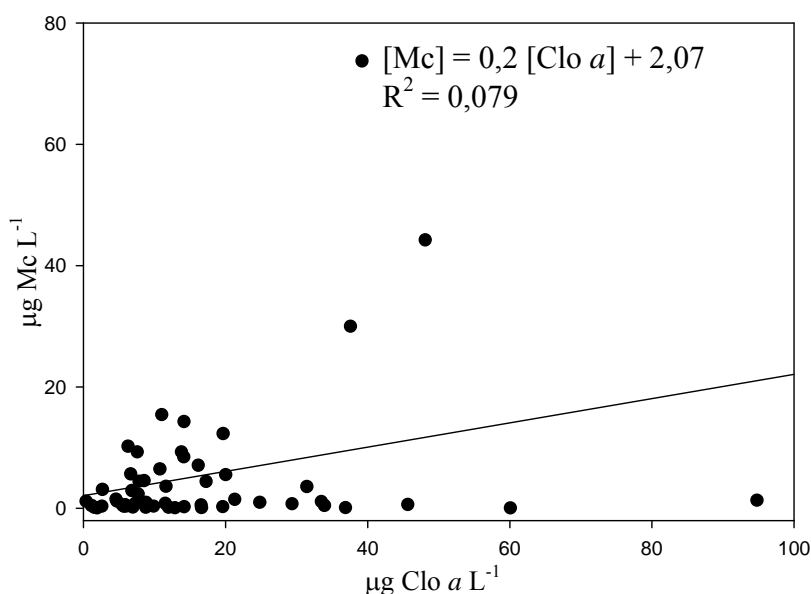
Correlación entre Mc y Clo *a* de cianobacterias solo en muestras positivas

Figura II.28. Correlación entre concentración de clorofila *a* de cianobacterias y de Mc en muestras las muestras no concentradas. En la primera figura podemos ver todas las muestras analizadas y en la segunda sólo se incluyeron las muestras que presentaron microcistinas.

Cuando se analizó la correlación microcistina-clorofila *a* en cada uno de los embalses que presentaron microcistinas por separado solamente en uno de ellos se pudo observar esta correlación, este fue el embalse de Santillana, que además de presentar el mayor número de muestras con microcistinas presentó una correlación positiva entre la concentración de éstas y la cantidad de clorofila *a* de cianobacterias Figura II.29. En esa figura aparte de la correlación entre clorofila *a* de cianobacteria y Mc podemos observar que a partir de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorofila *a* de cianobacterias podemos observar valores elevados de microcistinas. Curiosamente en este embalse, como hemos indicado en el capítulo I, la especie de cianobacteria que dominó la población cianobacteriana durante gran parte del periodo de muestreo fue *Microcystis aeruginosa*.

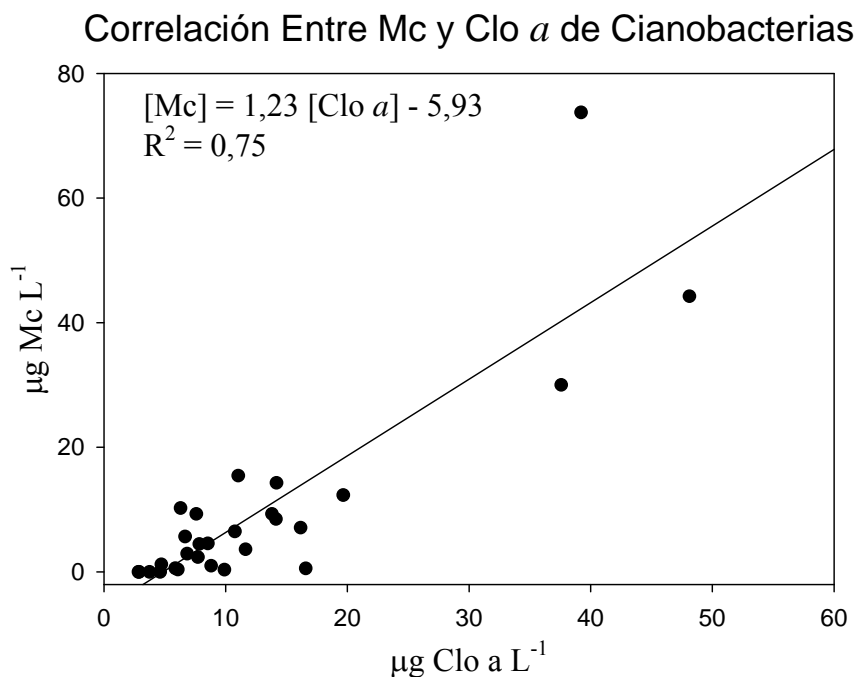


Figura II.29. Correlación entre concentración de clorofila *a* de cianobacterias y de Mc en muestras las muestras no concentradas en el embalse de Santillana.

Por la forma en que fueron tomadas las muestras de red, únicamente fue posible comparar éstas con las no concentradas a través de sus relaciones Mc / Clo *a* y no directamente en µg Mc L⁻¹. Cuando hacemos esta comparación, podemos observar que las relaciones de las muestras de red sistemáticamente tienen una mayor cantidad de Mc por unidad de clorofila que las muestras no concentradas (Figura II.30), los datos indican que la red incrementa en casi tres veces la relación Mc/Clo *a*, respecto a la muestra no concentrada, existiendo diferencias significativas (test Mann-Whitney en rangos, $P = 0,007$), no existiendo una correlación fuerte entre los datos de red y seston (datos no mostrados).

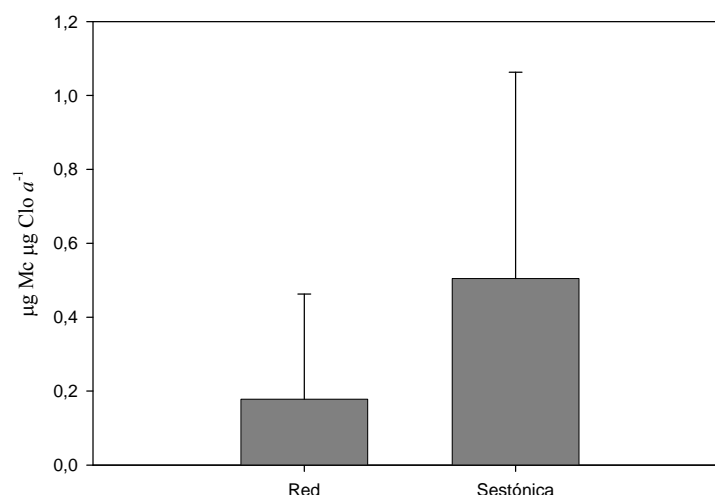


Figura II.30. Media de las relaciones microcistina-clorofila *a* y desviación estandar obtenidas en 2002 y 2003. Sólo se utilizaron los valores que mostraron toxinas en las dos muestras

4.3.10. Patrón temporal de aparición de microcistinas.

Una de los objetivos de este trabajo era estudiar si existía un momento a lo largo del año en el cual era más probable encontrar microcistinas en los cuerpos de agua de la Comunidad de Madrid, para ello se analizó en cada uno de los años estudiados el número de embalses que presentan microcistinas para cada uno de los meses analizados, tanto en las muestras concentradas por red que nos informarían de la potencialidad del sistema, como en las no concentradas que tiene un valor en la gestión. En los dos tipos de muestras y años (Figura II.31 y Figura II.32) observamos patrones de aparición muy similares, si bien en general el número de embalses que presentan toxinas es mayor en las muestras red por su mayor sensibilidad, tanto en cuanto al número de embalses que presentan este grupo de toxinas. El momento en que es más probable que un embalse de la Comunidad presente toxina es entre los meses de septiembre y octubre y en menor proporción noviembre. Un análisis especial merece el mes de Julio, que presenta en las muestras concentradas por red otro pico de probabilidad, que no aparece en las muestras no concentradas. Esto podría indicar que en general existe la potencialidad toxica en la población, pero no se da se alcanzan las



concentraciones necesarias de productores para que sea posible detectarla en las muestras no concentradas.

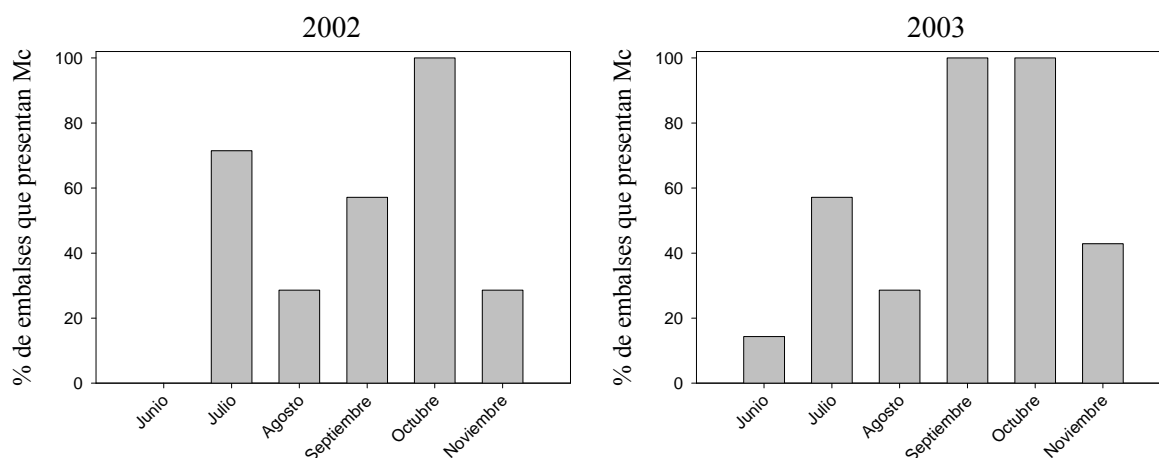


Figura II.31. Porcentaje de embalses que presentan microcistinas en las muestras concentradas por red. Porcentaje que presentan MC en los años objeto de estudio (2002 y 2003). N=7 de embalses analizados.

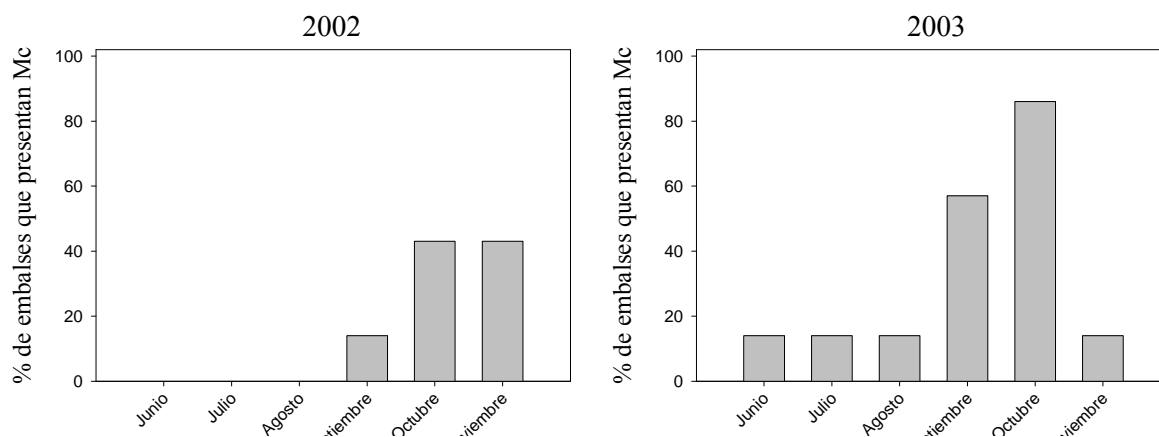


Figura II.32. Porcentaje de embalses que presentan microcistinas en las muestras sestonicas. Porcentaje que presentan MC en los años objeto de estudio (2002 y 2003). N=7 de embalses analizados.



5. Discusión

En el año 2002 cuando esta tesis comenzó los datos sobre presencia de microcistinas en los lagos, ríos y embalses españoles eran casi inexistentes. Esa falta de datos, sobre todo cuando se comparaban con los existentes en otros países de nuestro entorno, como por ejemplo Portugal hacía aconsejable hacer un estudio en profundidad de la presencia de este tipo de compuestos en aguas españolas y en nuestro caso particular, de su presencia en los embalses de la Comunidad de Madrid. El interés en la presencia de este tipo de compuestos en esta Comunidad se debe a la explotación intensiva de los recursos hídricos de los que dispone, especialmente de las aguas superficiales. En estas circunstancias se hacía recomendable realizar una vigilancia intensiva de los cuerpos de agua superficiales que son susceptibles de presentar organismos potencialmente productores de microcistinas.

En los últimos años el panorama respecto a las microcistinas ha cambiado de manera muy importante ya que propiciado fundamentalmente por la aparición en la legislación española de un valor guía para este tipo de sustancias (real decreto 140/2003), se ha empezado a estudiar el tema de forma sistemática en la mayor parte de las Cuencas Hidrográficas españolas. Nuestra legislación obliga a medir la concentración de microcistinas a la salida de las estaciones de potabilización o en el depósito de cabecera, cuando exista sospecha de eutrofización. Esta ley a nuestro entender presenta algunos problemas conceptuales, por un lado en el articulado de esta ley se habla de microcistinas totales, lo que dificulta su aplicación, puesto que para la mayor parte de las toxinas no existen estándares que permitan su cuantificación, haciendo imposible en muchos casos el determinar la concentración de microcistinas total. Tampoco establece ningún método de medida recomendado, dentro de los publicados en la literatura científica. Simultáneamente a la aparición de legislación, en los últimos años han comenzado a aparecer en revistas internacionales artículos que recogen la presencia de este tipo de toxinas en embalses y ríos españoles ((Moreno y col., 2005),(Aboal y col., 2005),(Aboal y Puig 2005),(Barco y col., 2004) y (Carrasco y col., 2006)).

El método de extracción propuesto en este trabajo varía ligeramente de otros descritos en la bibliografía. Los datos obtenidos muestran sin embargo que éste parece ser adecuado



para los propósitos que se perseguían en la realización de este trabajo. En general los artículos publicados que comparan diversas metodologías de extracción ((Barco y col., 2005) y (Fastner y col., 1998)), concluyen que el mejor extractante de las microcistinas es una mezcla de metanol-agua y que los valores ideales de metanol para extraerlas varían entre el 70% y el 80% de metanol, realizando dos extracciones y usando un baño de ultrasonidos. En estas condiciones se extrajeron más del 90% de la toxina sestónica. En general estos artículos utilizaron material liofilizado y no material filtrado a través de filtros GF/F ó GF/C que posteriormente es congelado hasta su análisis, que fue el método utilizado en este trabajo. Por ello se decidió realizar una pequeña comprobación de cuales seria las mejores condiciones de trabajo. En nuestro caso hemos encontrado existía una mayor eficiencia cuando utilizábamos metanol 90% para realizar la extracción, que utilizando metanol 75%. Este cambio en la concentración de metanol presentaba una ventaja adicional que nos permitía determinar la concentración de clorofilas y la concentración de toxinas simultáneamente. Las pequeñas diferencias que encontramos entre nuestro método y los publicados, pueden deberse por una lado al diferente material utilizado (filtros y no liófilos) y por otro al diferente volumen de extracción utilizado. Cuando se extraen liófilos el volumen suele ser de 2-3 mL (en función del número de extracciones), por el contrario cuando se extraen filtros GF/F se necesita utilizar un volumen mayor de hasta 7 mL mejorando quizás la extracción con concentraciones mayores de metanol. A la vista de los resultados obtenidos podemos concluir que el método utilizado es válido y que es capaz de extraer como media más del 99% de la toxina sestónica presente en el interior de las células.

Durante los últimos años se ha intentado determinar cual podría ser la forma más correcta de relativizar los valores de microcistinas a la biomasa presente en las muestras. En los experimentos de laboratorio como en las muestras de campo, los valores que se utilizan con más frecuencia son el peso seco y el biovolumen (Kardinaal y Visser 2005). La utilización del peso seco, sin duda la más utilizada, aunque muy útil tiene desde nuestro punto de vista tiene una serie de inconvenientes que en muchos casos no se han tenido en cuenta, tales como : El incremento en peso de que pueden causar la presencia de otros organismos no algales (zooplankton), partículas inorgánicas en suspensión ó sales disueltas y que pueden afectar a la medida desvirtuando parcialmente los resultados obtenidos, al subestimar la toxina presente por unidad de peso. Por otro lado la utilización del biovolumen tiene como principal



inconveniente la gran cantidad de tiempo que es necesario invertir en el análisis de cada muestra y que puede llegar a ser limitante en los análisis. En nuestro caso, hemos optado por utilizar como medida de biomasa la clorofila *a*, pues a pesar de que las concentraciones de clorofila por célula pueden variar según varios factores fisiológicos (p.e historia luminosa o la concentración de nutrientes), es una medida que evita en parte los factores que pueden afectar en el peso seco (zooplancton, particular inorgánicas en suspensión y sales disueltas sobre todo) y por otro lado es mucho más fácil de calcular que el biovolumen, facilitando los análisis.

Cuando analizamos los datos sobre presencia de microcistinas en la Comunidad de Madrid observamos que el 100% de los embalses estudiados presentaban microcistinas bien en las muestras concentradas o en la “fracción sestónica sin concentrar”. Como vimos en el capítulo I las especies de cianobacterias que presentan capacidad potencial de producir estos compuestos son muy comunes y podemos concluir que con los datos obtenidos, que las microcistinas también lo son. También nos parece importante destacar que las concentraciones encontradas han superado en numerosas ocasiones el valor de $1 \mu\text{g Mc L}^{-1}$, valor que se ha establecido como valor guía para agua de consumo a la salida de la ETAP en la legislación vigente. Aunque es importante puntualizar que los datos presentados en este trabajo son siempre de agua bruta y no después del tratamiento potabilización, por lo que este valor únicamente nos servirá, a lo largo de la discusión para establecer un valor a partir del cual sería necesario establecer nuestro límite de alarma y comprobar que estos compuestos no existen en el agua tratada.

Este trabajo también muestra que estas toxinas son muy comunes en nuestra Comunidad, no únicamente por aparecer en todos los embalses analizados, sino por el número de muestras en las que este tipo de compuestos se detectó, el 60% de las muestras de red presentaron microcistinas. Estos valores son muy parecidos a otros encontrados en el resto del mundo y en particular en Europa, como Alemania (Fastner y col., 1999) donde el 72% de las muestras presentaron microcistinas, Dinamarca (Henriksen y Moestrup 1997) donde el 66% de las muestras aparecieron este tipo de compuestos y centrándonos aun más en la zona mediterránea, estos valores se repiten, encontramos valores del 70% en Francia (Vezie y col., 1997) y del 60% en Portugal (Vasconcelos 1994). Estos datos tan homogéneos indicarían que



nos encontramos ante un problema paneuropeo puesto que este tipo de toxinas son muy comunes en los lagos y embalses del continente. De todas maneras nos parece importante señalar que los muestreos buscando este tipo de compuestos en el en la zona templada del hemisferio norte, incluido este trabajo, se realizan normalmente en los momentos en los que las cianobacterias presentan una mayor importancia dentro de la población fitoplanctónica y cuando la concentración de algas es más importante (meses de verano y de otoño (Oliver y Ganf 2000), y posiblemente en los meses de invierno y principios de primavera no suelen encontrarse tantas muestras que presenten microcistinas.

Las concentraciones de microcistinas encontradas en este trabajo presentan grandes diferencias no sólo entre los diferentes embalses sino también entre los dos años analizados. El año 2003 presentó un mayor porcentaje de muestras en las cuales fue posible detectar microcistina. En este año en todos los embalses, excepto en el embalse de el Vellón, se detectó la presencia de microcistinas en un mayor número de muestreos, en total, una media del $46\% \pm 32\%$ de los muestreos realizados en el cada embalse presentaron microcistinas en 2002 mientras que en el 2003 este se elevó hasta el $70\% \pm 18\%$. Estas diferencias sin embargo no fueron significativas debido a la gran desviación estándar que se observa, sobre todo en el 2002, que existieron diferentes tendencias en los dos años estudiados en cuanto a la importancia que tuvieron estas toxinas en los embalses estudiados. Estas diferencias no solamente se observaron en el número de muestras que presentaron microcistinas, sino también en la concentración que presentaron que fueron también mayores en el año 2003, valga como ejemplo que en el año 2003 fue posible detectar microcistinas en la fracción no concentrada en todos los embalses analizados mientras que en el año 2002 únicamente en cuatro de los siete embalses analizados fue posible detectarlas. Es difícil comparar los datos obtenidos con los presentes en la bibliografía, en general los estudios sobre la presencia de microcistinas suelen agruparse en dos tipos de artículos: unos en los que estudia en profundidad un único embalse a un embalse (p.e. (Maatouk y col., 2002); (De Magalhaes y col., 2001); (Briand y col., 2002) y (Welker y col., 1999)), y otros que suelen afectar a múltiples cuerpos de aguas, normalmente a nivel nacional, que no suelen tener en cuenta los diferentes embalses analizados individualmente presentando datos globales a nivel de país o región (p.e.(Fastner y col., 1999); (Henriksen y Moestrup 1997); (Vasconcelos 1994); (Willame y col., 2005) y (Kim y col., 1995)). Por esta razón son muy escasos los trabajos



publicados en los que se indica el número de cuerpos de agua que presentó toxinas. Entre los trabajos que presentan datos sobre el número de embalses que presentaban microcistinas en una región o país cabe destacar: Park y col., 1998 donde encontraron que el 80% de los embalses y lagos analizados en Corea presentaban microcistinas Aboal y Puig 2005 que mostraron que el 100% de los embalses analizados de la cuenca del Segura presentaban microcistina, si bien en este trabajo los organismos productores en los embalses eran bentónicos y no planctónicos y finalmente Graham y col., 2004 que en el medioeste norteamericano encontraron que el 78% de los embalses analizados presentaban este tipo de toxinas. Estos datos muestran que los valores encontrados en la Comunidad de Madrid, donde el 100% de los embalses analizados presentaban microcistinas, son muy similares a los encontrados en países tan distantes como Corea y Estados Unidos. Esta similitud en los datos parece indicar que en la mayor parte de los embalses y lagos eutróficos es posible detectar microcistinas en algún momento del año y que en principio muchos ellos tienen la capacidad de “producir” afloramientos tóxicos, si se dan las condiciones ambientales adecuadas.

Siguiendo más en profundidad el análisis de los valores de microcistinas y como se relacionaron con las concentraciones de clorofila encontradas los diferentes años, podemos observar que en año 2002 se presentaron mayores concentraciones de clorofila, que las encontradas en 2003, sin embargo salvo en el embalse de Lozoya, fue este año 2003 el que presentó mayores máximos de toxicidad (expresadas como $\mu\text{g Mc } \mu\text{g clo } a^{-1}$), esto como ya hemos indicado en los resultados indica que los organismos presentes en el año 2003 poseían una mayor capacidad tóxica que los que aparecieron el año anterior, lo que se vio reflejado en los también mayores valores de microcistina por litro encontrados en 2003 respecto a 2002. Comparando los valores de la relación clorofila microcistina encontrados en las muestras de red con los encontrados en Alemania por Fastner y col., 1999, donde las muestras fueron recogidas con una red de plancton de 40 μm , en lugar de con la de 80 μm utilizada en este trabajo, observamos que los valores fueron similares a los descritos en los embalses de la Comunidad. En los lagos alemanes el rango de la relación toxina/clorofila se situó entre 0 y 2,5 $\mu\text{g Mc } \mu\text{g Clo } a^{-1}$ (este valor máximo se encontró en una muestra dominada por *Planktothrix*), mientras que en Madrid, el rango encontrado fue de entre 0 y 2,45 $\mu\text{g Mc } \mu\text{g Clo } a^{-1}$. A pesar de esta similitud en los valores máximos, analizando los datos más en



profundidad, el percentil 75 se sitúa en los embalses de la Comunidad entre los valores de 0,52 y 0,02 $\mu\text{g Mc } \mu\text{g Clo } a^{-1}$, mientras que en el caso de los lagos alemanes (Fastner y col., 1999) se obtuvo un valor superior para el percentil 75 inferior al encontrado en Madrid, siendo este ligeramente superior a 0,3 $\mu\text{g Mc } \mu\text{g Clo } a^{-1}$. Esta diferencia puede deberse a que en nuestro caso hemos utilizado todas las muestras que presentaron microcistinas, incluyendo cuando *Microcystis* no dominó la población de cianobacterias, mientras que en el trabajo de Fastner y col., 1999 se consideraron por separado las muestras donde *Microcystis* dominó la población de las muestras en las que fue subdominante, y el valor de 0,3 $\mu\text{g Mc } \mu\text{g Clo } a^{-1}$ es el obtenido para las muestras en que *Microcystis* dominó. Respecto al valor máximo encontrado, si parecen existir claras diferencias entre los valores encontrados para las muestras en las que dominó *Microcystis*, cuando las comparamos con las alemanas. El máximo encontrado en los embalses de la Comunidad de Madrid es muy superior al encontrado en latitudes superiores como por ejemplo Alemania, el valor más alto de la relación toxina/clorofila en los embalses alemanes, cuando dominó esta especie fue de alrededor de 1 mientras que en los embalses analizados en este estudio este valor fue de 2,45, esta diferencia junto con el mayor valor encontrado en el límite superior del percentil 75% parece indicar que las cepas de *Microcystis*, presentes en España, y probablemente en la zona mediterránea presenta una mayor capacidad de producir este tipo de compuestos.

En total durante los dos años estudiados, se han detectado afloramientos en los que fue posible detectar microcistinas en tres embalses diferentes: Santillana, Valmayor y Picadas (esto representa que casi el 50% de los embalses analizados). Además de otros dos afloramientos de cianobacterias donde no fue posible detectar microcistinas (uno en Valmayor y otro en Lozoya, (para más información ver capítulo I). Todos los afloramientos tóxicos se caracterizaron por presentar en alguno de los puntos analizados concentraciones superiores a 1 $\mu\text{g Mc L}^{-1}$, alcanzándose las concentraciones máximas en el embalse de Santillana con valores ligeramente superiores a 70 $\mu\text{g Mc L}^{-1}$. Estas concentraciones obtenidas, cabe recalcar, se obtuvieron tomando la muestra a 0,5 m de profundidad evitando en caso de existir recoger la acumulación superficial. Bajo estas condiciones las concentraciones encontradas están entre las más altas descritas en la bibliografía cuando *Microcystis* dominó la población fitoplanctónica (p.e (Fastner y col., 1999), (Welker y col., 2003) y (Cook y col., 2004)), si bien el hecho de no existir una metodología de muestreo perfectamente definida, dificulta las comparaciones,



especialmente cuando existen acumulaciones presentes (muestras que pueden presentar concentraciones de microcistinas del orden de mg L^{-1}) ((Cook y col., 2004) y (Sivonen y Jones 1999)) lo que pueden hacer variar en gran medida los valores de concentración de microcistina por litro. Cuando analizamos la diferencias entre los distintos afloramientos, podemos observar que presentaron grandes variaciones en la concentración de microcistinas y en la relación microcistina clorofila a pesar de que todos estuvieron dominados por la misma especie de cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, las concentraciones máximas de microcistina variaron de más de $70 \mu\text{g Mc L}^{-1}$ en el embalse de Santillana en el año 2003 a valores ligeramente por encima de $1 \mu\text{g Mc L}^{-1}$ en el embalse de Picadas en ese mismo año, a pesar de encontrarnos valores superiores de clorofila en el embalse de Picadas que los existentes en el de Santillana. Estas variaciones entre los afloramientos han sido encontradas en multitud de ocasiones y se han explicado por las enormes variaciones en producción de toxinas que se puede encontrar entre cepas de la misma especie de *Microcystis* ((Moreno y col., 2004) y (Kardinaal y Visser 2005)) incluso cuando estas cepas han sido aisladas de un único embalse en un mismo momento y que impiden determinar la toxicidad de una muestra observando al microscopio la composición de especies que una muestra presenta.

Cuando analizamos las variaciones temporales que se observan en los diferentes embalses podemos ver que en cortos periodos de tiempo pueden existen grandes variaciones en la concentración de microcistinas, dentro del mismo embalse encontramos variaciones de un orden de magnitud en una semana y a lo largo del año de más de tres ordenes de magnitud. Estas variaciones son similares a los encontradas por ejemplo por Welker y col., 2003 en el lago Müggelsee, por Kotak y col., 1995 en tres lagos hipereutróficos en Canadá o por Wicks y Thiel 1990 en el embalse de Hartbeespoort en Sudáfrica y confirma que las grandes variaciones tanto espaciales (entre lagos diferentes o dentro del mismo lado) como temporales son muy comunes. Estas grandes variaciones y lo comunes que son aconsejan que las frecuencias de muestreos en los embalses en los que se sospecha la presencia de cianobacteria potencialmente tóxicas, sean elevadas con el fin de cuantificar microcistinas en cortos espacios de tiempo y poder ser capaz así de responder a los cambios bruscos de concentración que pueden encontrarse. Estas variaciones pueden deberse desde procesos de mezcla debidos a procesos físicos como el viento, como ocurrió en Santillana en 2002 o ser de origen biológico



como discutiremos posteriormente al hablar de las correlaciones entre la concentración de clorofila y la de microcistina.

Los datos existentes sobre microcistinas en embalses españoles son limitados, únicamente se han publicado cuatro trabajos sobre presencia de microcistinas en embalses españolas en revistas internacionales, uno de ellos metodológico (Barco y col., 2002) en el cual se analizaron diversas muestras de afloramientos sin precisar en las condiciones en que se tomaron, que cianobacterias estaban presentes o la concentración de clorofila que presentaban las muestras. En otro de ellos se publicaron datos sobre la presencia de microcistinas en el embalse del Atazar, embalse que presentó un afloramiento de *Planktothrix rubescens* en el año 2003 (Barco y col., 2004) que mostró una concentración máxima de $19,1 \mu\text{g L}^{-1}$, que es después de la determinada en el embalse de Santillana en este trabajo la mayor concentración de microcistinas por litro publicadas en España. Otro de los trabajos analizó varios embalses situados en la cuenca del Segura (Aboal y Puig 2005), en esta cuenca las microcistinas presentes en la columna de agua presentaron valores medios y bajos (inferiores a $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$) y curiosamente en este caso los productores fueron cianobacterias bentónicas y no planctónicas que son las productoras más comunes en lagos y embalses. Estas cianobacterias bentónicas presentaron concentraciones de microcistinas relativamente bajas con un valor máximo de $8,611 \mu\text{g g}^{-1}$, lejano de los valores encontrados en afloramientos tóxicos de organismos planctónicos en los cuales de manera frecuente se encuentran valores tres ordenes de magnitud superiores (del orden de $\mu\text{g mg}^{-1}$) similares a los encontrados en las acumulaciones de este trabajo (datos no mostrados) y en otros países Europeos ((Henriksen) y (Vasconcelos y col., 1996)). Por último esta la cuenca hidrográfica en la cual se publicado datos de presencia de microcistinas ha sido la cuenca del Guadiana (Moreno y col., 2005). En este trabajo los organismos potencialmente productores encontrados en la columna de agua fueron *M. aeruginosa* y *Oscillatoria* spp. y las concentraciones máximas detectadas fueron inferiores a $0,12 \mu\text{g Mc L}^{-1}$. Podemos observar que los valores detectados en estos trabajos (especialmente en la cuenca del Segura y del Guadiana) se encuentran lejos de los valores obtenidos es este trabajo con concentraciones máximas superiores a $70 \mu\text{g Mc L}^{-1}$. Estas diferencias encontradas pueden deberse por un lado a que *M. aeruginosa*, posiblemente el principal organismo productor de microcistinas en aguas mediterráneas ((Willame y col., 2005) y (Cook y col., 2004)) no se encontrase en concentraciones demasiado altas, o bien que las la cepa



presente tuviese una baja capacidad de producción de este tipo de compuestos, como ocurrió en el embalse de Picadas en el año 2003, donde un afloramiento dominado por *Microcystis aeruginosa* con una concentración máxima de clorofila superior a $100 \mu\text{g L}^{-1}$, presentó concentraciones de microcistinas ligeramente superiores a $1 \mu\text{g Mc L}^{-1}$.

Cuando comparamos la concentración de microcistinas con la concentración de clorofila *a* presente en cada momento, podemos observar que como norma general la relación toxina/clorofila es máxima, antes o después del momento en que ocurren los picos máximos de clorofila. Esto indica que la población fotosintética es más tóxica justo antes o después de que se alcance el pico máximo de biomasa. Esto parece coincidir con los resultados encontrados por ((Welker y col., 2003) y (Kardinaal y Visser 2005)) que indican que son más tóxicos los organismos existentes cuando las concentraciones de clorofila o biomasa son menores. La explicación ofrecida por estos autores es que durante el desarrollo del afloramiento se seleccionan las cepas menos tóxicas, que incrementan más su biomasa que las más tóxicas durante el desarrollo del afloramiento, de esta manera al alcanzar la biomasa máxima, las cepas productoras de toxinas serían minoritarias. Esta conclusión soporta parcialmente los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo, puesto que las mayores relaciones toxina clorofila no se alcanzaron nunca en los momento es que la concentración de clorofila fue máxima, pero en nuestro caso no encontramos la correlación negativa entre la concentración de microcistinas y la biomasa cianobacteriana (datos no mostrados), indicando que podrían existir otros factores, posiblemente fisiológicos, que modularan la concentración intracelular de microcistinas durante los episodios tóxicos y que explicaran los resultados obtenidos.

En las correlaciones entre microcistina y clorofila también podemos observar que los resultados obtenidos dependen por un lado de la metodología utilizada y del embalse que se está analizando. Cuando analizamos las muestras de red podemos observar que existe una correlación positiva entre la cantidad de clorofila *a* que tienen las muestras y la concentración de microcistinas que las mismas presentan, en la bibliografía existen trabajos en los cuales esta también se encontró una correlación positiva (p.e. (Kotak y col., 1995) y (Welker y col., 1999)), sin embargo cuando se utilizaron los datos de las muestras sin concentrar, no fue posible encontrar esta correlación. Esta diferencia entre los datos de las muestras concentradas



por red y sin concentrar puede deberse al efecto que otros organismos fotosintéticos pueden tener sobre la medida de clorofila. Al utilizar una red de 80 μm de tamaño de poro, la muestra se enriquece en organismos coloniales de gran tamaño, como pueden ser *Microcystis*. Esta mayor proporción del organismo productor mas importante en los embalses analizados podría explicar la correlación positiva en las muestras concentradas por red y no en las no concentradas. Junto con este factor de concentración de organismos potencialmente tóxicos, ((Mikalsen y col., 2003) y (Via-Ordorika y col., 2004)) han mostrado que dentro del genero *Microcystis* existe una mayor probabilidad de producir microcistinas cuanto mayor es el tamaño de la colonia, este factor también influiría en el enriquecimiento en microcistina respecto a clorofila que observamos en las muestras de red. La suma de estos dos efectos sumados sería por lo tanto la razón que explicara porque existe una correlación en las muestras concentradas por red y no en las no concentradas.

Un análisis aparte merece el embalse de Santillana, único embalse que mostró correlación significativa entre la concentración de clorofila y la concentración de microcistina en el año 2003. Esta diferencia entre los datos totales y los encontrados en el embalses de Santillana probablemente se deben no sólo al organismo dominante que se encuentra en ese embalse (para más información ver capítulo I), sino que además parece ser que en todo momento la población de *Microcystis* estuvo dominada por organismos con una gran capacidad de producción de microcistinas lo que explicaría el porque fuimos capaces de detectar microcistinas durante casi todo el periodo de muestreo, aunque las concentraciones de clorofila de cianobacterias fueran relativamente bajas.

Estudiando el momento en el cual las microcistinas aparecieron en los embalses analizados podemos observar la existencia de ligeras diferencias entre las muestras concentradas por red y las no concentradas. En las muestras concentradas por red aparece un incremento en el número de embalses que presentan microcistinas en el mes de julio que no se ve reflejado en las muestras no concentradas. Esto podría indicar que en ese momento no se dan las condiciones adecuadas para que las cianobacterias toxicas dominen la población en dicho mes, pero que estas si las condiciones adecuadas se aparecen, como ocurrió en Santillana 2003, las microcistinas pueden aparecer y alcanzar concentraciones extremadamente altas, lo que indicaría que el pico de potencialidad tóxica, no lleve aparejado



la presencia de toxinas en la fracción no concentrada. Por otro lado en los meses de septiembre, octubre (el mes con mayor riesgo) y noviembre no aparecen grandes diferencias entre muestras concentradas por red y no concentradas, lo que indicaría que son los meses con mayor probabilidad de encontrar microcistinas en los embalses de la Comunidad de Madrid. En otros países nos encontramos con dinámicas de aparición similares, pero desplazadas temporalmente, en países europeos de latitudes más elevadas como Dinamarca (Henriksen y Moestrup 1997) y Alemania (Fastner y col., 1999) los valores máximos suelen encontrarse en los meses de junio, julio, agosto y septiembre con un máximo en el mes de julio, aunque en Alemania donde *Planktothrix* tiene una especial incidencia los meses de septiembre y octubre presentan también muestras donde es posible detectar microcistinas. Las diferencias entre España y esos países, son probablemente debidos a diferencias climatológicas existentes, que inducen estos cambios observados pasando los máximos de localizarse en verano en centroeuropa, a encontrarse a finales del verano principios del otoño en la Comunidad de Madrid. No existen datos de cual es la situación en otros países mediterráneos acerca de cual es la distribución de microcistinas en lagos y embalses a lo largo del verano y otoño, pero parece lógico suponer que nos deberíamos de encontrar una situación similar a la que hemos descrito para Madrid.

Finalmente nos queda analizar los diferentes tipos químicos de microcistinas encontrados durante la realización de este trabajo. Como en el resto de Europa las toxinas mayoritarias en nuestro estudio fueron por orden de frecuencia la microcistina LR, RR y la YR (Via-Ordorika y col., 2004) y (Sivonen y Jones 1999), esto diferencia a las microcistinas producidas por las cepas europeas de las encontradas en el lejano oriente donde la microcistina mayoritaria es la microcistina RR (Kim y col., 1995) (Park y col., 1993) (Baldia y col., 2003), si bien las diferencias metodológicas (extracción metanólica en Europa y extracción con 5% de acético en el lejano oriente) podría ser la responsable de las diferencias observadas, al extraer los métodos empleados de manera diferencial las microcistinas con diferente hidrofobicidad (especialmente la microcistina RR) (Fastner y col., 1998). La importancia de determinar los tipos químicos de las microcistinas presentes en las muestras, especialmente de las mayoritarias, viene de las grandes diferencias en toxicidad que estas presentan (Sivonen y Jones 1999). Las variantes LR y YR han sido identificadas dentro del grupo de las toxinas más tóxicas, con DL_{50} intraperitoneal de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, mientras que la



segunda en importancia la microcistina RR muestra un menor toxicidad con una DL_{50} intraperitoneal 12 veces menor de $600 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Sivonen y Jones 1999). Esta diferencia de toxicidad no se tiene en cuenta en la legislación vigente, donde el valor de TDI se calculo considerando únicamente la toxicidad de la microcistina LR. Para evitar estas diferencias de toxicidad (Wolf y Frank 2002) definieron el concepto de “microcistina equivalente”, con el cual intentaban al expresar las concentraciones de microcistinas teniendo en cuenta su toxicidad. Para ello multiplicaban la concentración de cada microcistina por un factor de equivalencia de toxina (TEF) que seria de uno para la microcistina LR y para el resto el resultado de dividir la toxicidad de la microcistina LR por la suya (en el caso de la Mc-RR seria de 0,08). Utilizando esta metodología le valor máximo presentado en Santillana en 2003 de $73.7 \mu\text{g Mc l}^{-1}$ tendría un valor de $42 \mu\text{g}$ “microcistina equivalente” L^{-1} (considerando que las microcistinas desconocidas tenían un $\text{TEF} = 1$). Esta metodología nos permitiría una mejor gestión al tener en cuenta no solamente la concentración de microcistinas sino la toxicidad de las mismas.



CAPÍTULO III

CAPÍTULO III



Variaciones de los tipos de microcistinas y su correlación con las variaciones en el gen *mcyB* en el embalse de Santillana

1. Introducción

Existe una gran diversidad en los tipos de microcistinas que producen las cianobacterias, y esta diversidad es importante porque las diferentes microcistinas presentan grandes variaciones en la toxicidad en función de la secuencia peptídica que presentan (Sivonen y Jones 1999). Esta elevada diversidad química dentro de las microcistinas se ha intentado relacionar con cambios en la secuencia de las proteínas responsables de su síntesis ((Mikalsen y col., 2003; Kurmayer y col., 2002)).

1.1. Estructuras de las péptido sintetetasas.

En el capítulo II, ya hemos tratado brevemente este tipo de proteínas. Ahora analizaremos en profundidad su estructura y las funciones que presentan.

Las péptido sintetetasas son proteínas modulares donde cada módulo se encarga de realizar la incorporación de un aminoácido a la molécula en crecimiento. Cada uno de estos módulos está compuesto por varios dominios, cada uno de ellos con una actividad enzimática diferente. Se define como módulo cada sección de la cadena



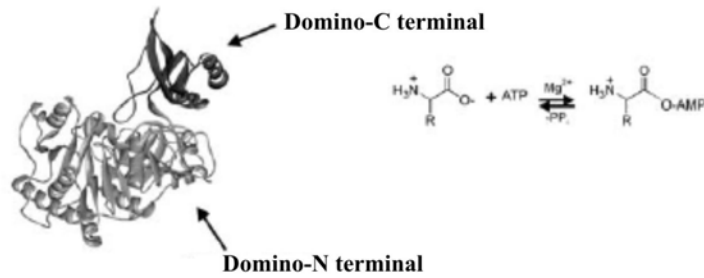
polipeptídica de una NRPS que es responsable de la incorporación de una subunidad al péptido en crecimiento (von Dohren y col., 1997). En la naturaleza podemos observar que cada uno de estos módulos puede coincidir con una proteína, pero en algunos casos una proteína puede poseer varios módulos (von Dohren y col., 1997). Como hemos visto se necesitan para lograr la síntesis de los péptidos no ribosómicos al menos cuatro dominios o actividades enzimáticas descritos a continuación:

Dominio de adenilación: Es el dominio responsable de la activación específica de los precursores de la síntesis (Figura III.1), que pueden ser grupos de aminoácidos, imino-ácidos, hidroxí-ácidos o varios ácidos carboxílicos. En todos los casos la activación tiene lugar cuando se transfiere alguno de estos grupos al AMP. Además, en este dominio se encuentra el principal mecanismo de control que asegura que la secuencia primaria de los péptidos sintetizados por las péptido sintetetas sea correcta, aunque no es el único mecanismo. En todos estos dominios se han encontrado diez regiones conservadas (A1-A10) (Welker y Von Dohren 2006). La especificidad de este dominio viene dada por la estructura tridimensional de este centro activo que sólo permite la entrada del sustrato específico de la adenilación (Finking y Marahiel 2004). En bacterias se han descrito 200 dominios de adenilación, relacionados o con sistemas NRPS o con acil-CoA sintetetas.

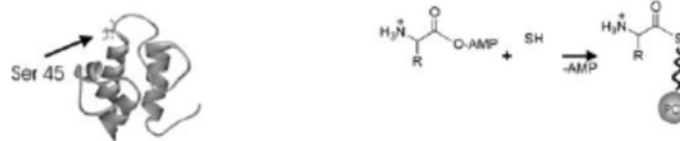
Dominio de Tiolación: Son los encargados de transportar los aminoácidos o los péptidos que están siendo sintetizados desde el dominio de adenilación al centro del dominio de condensación (Figura III.1). Todos los dominios descritos de este tipo poseen un residuo de serina conservado. Este será el sitio que posteriormente es modificado postranscripcionalmente con la unión de una coenzima, que normalmente es un grupo fosfopanteteínico (4'PP), (Finking y Marahiel 2004), y en donde se unirá el aminoácido o el péptido.



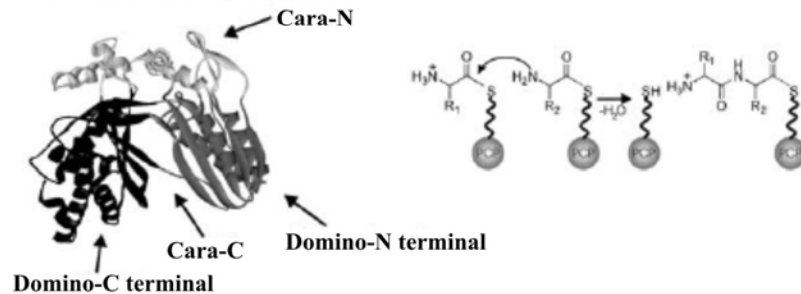
Dominio de adenilación



Dominio de tiolación



Dominio de condensación



Dominio tioesterasa

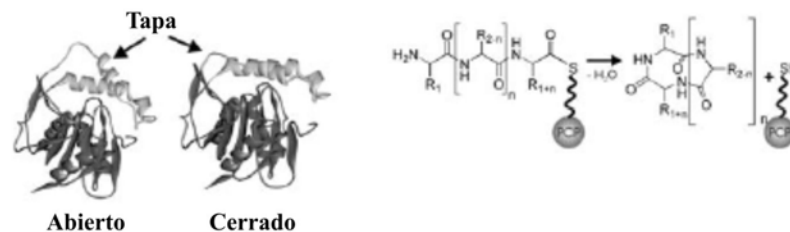


Figura III.1. Estructura tridimensional de los dominios de adenilación, tiolación y condensación. (extraído de (Finking y Marahiel 2004))

Dominio de condensación: El dominio de condensación posee en el centro activo un lugar de unión para dos péptidos incorporados al transportador fosfopantoteínico, uno de ellos viene del modulo anterior y el otro del modulo posterior de manera que en este dominio se cataliza la formación del enlace peptídico (Welker y Von Dohren 2006) (Figura III.1).



Dominio tioesterasa: No es directamente responsable de la síntesis del péptido, pero es el dominio responsable de liberar el péptido ya terminado del portador fosfopanteteínico al final de la síntesis (Figura III.1). Esta liberación se da a través del ataque nucleofílico de un intermedio acil-O-enzima tioesterasa al péptido ya formado (Finking y Marahiel 2004).

Aparte de estos dominios imprescindibles existen otros dominios accesorios que suelen presentarse en los sistemas NRPS, algunos de ellos son: dominio de heterociclación necesario en el caso de todos los péptidos cíclicos, como es el caso de las microcistinas, de epimerización y racemasas, responsables de modificar los aminoácidos a la forma D, formil-trasferasas, N-metilasas y dominios de oxidación y de reducción (Welker y Von Dohren 2006).

1.2. Péptido sintetetasas responsables de la síntesis de microcistinas .

Como hemos visto, son cuatro los genes que presentan actividad péptido sintetasa que están en el operón responsable de la síntesis de las microcistinas. El *mcyE* que codifica una proteína mixta poliquétido-péptido sintetasa responsable de terminar la síntesis del Adda y que une la parte poliquétido sintasa y péptido sintetasa catalizando la unión del Adda y el aminoácido glutamato presente en la molécula por medio de un enlace con el grupo carboxilo en β . Posteriormente y en orden, nos encontramos tres péptido sintetetasas que actúan de manera coordinada y consecutiva. El gen *mcyA* codifica la enzima responsable de la incorporación de los dos siguientes aminoácidos de la molécula de microcistina metil-dehidroalanina (Mdha) y L-Ala. El primero en ser incorporado es una alanina que es posteriormente modificada por un dominio N-metiltransferasa (NMT) presente en McyA transformándola en Mdha. Posteriormente se incorpora otra L-Ala que también es modificada por esta enzima gracias a un dominio de epimerización que presenta pasando a D-Ala (Challis y col., 1999)). El siguiente gen *mcy*, el gen *mcyB*, posee el primer dominio de adenilación responsable de la



incorporación del primero de los dos aminoácidos variables, que dan nombre a la nomenclatura de las microcistinas (para mas información ver capítulo II), y del siguiente, uno de los aminoácidos no proteinogénicos que posee la molécula, el D- β -MetilAsp. Respecto a este aminoácido, cabe destacar que el grupo carboxilo en α no es activado, sino el β . Esta característica química de la molécula no microcistina no ha podido correlacionarse con la secuencia de este dominio de adenilación puesto que el dominio de condensación no pertenece al cluster de los dominios formadores de enlace peptídico L-D. Queda por incorporar el último aminoácido variable en la molécula, esto es realizado por la tercera péptido sintetasa del operón, *mcyC*. Esta proteína posee además un dominio tioesterasa que va a ser el responsable de la liberación del péptido ya formado.

1.3. Variantes químicas dentro de las microcistinas.

Como hemos descrito, en la actualidad se han identificado más de 70 variantes químicas diferentes de microcistinas (Codd y col., 2005), si bien cuando se analizan las cepas aisladas de los organismos potencialmente productores observamos que en general cada cepa sólo produce normalmente una o dos microcistinas mayoritarias. Por ejemplo, una de las cepas perteneciente al genero *Microcystis*, la cepa *Microcystis* sp. PCC7108, presenta dos microcistinas mayoritarias Mc-LR y su variante desmetilada Mc-(D-aspp³)-LR y otras dos formas minoritarias Mc-RR y Mc-YR (Dittmann y col., 1997). La utilización en los últimos años de la técnica de espectrometría de masas conocida como Maldi-Tof (Desabsorción/Ionización de Matriz Asistida por Laser – Espectrometría de Masas por Tiempo de Vuelo) ha permitido detectar la presencia de microcistinas en muestras increíblemente pequeñas (es capaz de detectar la presencia de este tipo de compuestos en colonias individuales de *Microcystis*). De este modo, aplicar esta metodología a las muestras de campo ha permitido analizar el número de variantes de microcistinas que son capaces de producir colonias individuales del genero *Microcystis* en condiciones naturales. Así, por ejemplo (Via-Ordorika y col., 2004)



analizando más de 250 colonias pertenecientes al género *Microcystis* llegaron a encontrar hasta 8 variantes diferentes de microcistinas. Por otro lado, las cepas de *Microcystis* aisladas en la Comunidad de Madrid en general presentan típicamente dos o tres microcistinas mayoritarias y es posible llegar a encontrar en total mas de 10 tipos diferentes de microcistinas producidas por un único organismo productor, aunque en este caso los datos se obtuvieron mediante análisis por HPLC y no por Maldi-Tof. Las determinaciones por HPLC permite detectar un mayor numero de variantes minoritarias (D. Sanchis comunicación personal), puesto que normalmente se parte de mayores cantidades de biomasa para realizar los análisis. Como hemos visto en el capítulo II (XX), de todas la variantes encontradas, son tres las microcistinas mayoritarias en todo el mundo (p.e. (Via-Ordorika y col., 2004) y (Sivonen y Jones 1999)) incluida la Comunidad de Madrid (Carrasco y col., 2006), éstas son las variantes LR, RR e YR, si bien generalmente las muestras suelen presentar simultáneamente como mayoritarias sólo una o dos de estas variantes.

Esta gran diversidad de microcistinas producidas por un único organismo que en principio presenta un único operón de genes *mcy*, parece indicar que los dominios de adenilación de los genes *mcy*, que son los principales responsables de la especificidad en el tipo de aminoácido incorporado, no muestran una eficiencia muy elevada en el reconocimiento de dichos aminoácidos. (Kurmayer y col., 2002) Por tanto, sugieren que no es posible determinar el tipo de microcistina producida por un organismo en función de la secuencia genética que presentan las péptido sintetetas y concluyen que esta inespecificidad impediría hacer ningún tipo predicción respecto a las microcistinas producidas. Sin embargo, (Mikalsen y col., 2003) posteriormente indicaron que la secuencia de aminoácidos que presentaban los dominios de adenilación sí podía utilizarse para predecir el tipo de microcistinas generado por un organismo particular, al menos en el caso de las microcistinas producidas mayoritariamente. Estos datos contradictorios parecen indicar que es necesario un estudio en mayor profundidad de este tema antes de poder concluir nada.



1.4. Diversidad genética de los potenciales productores de microcistinas en los afloramientos.

En los últimos 5 años se han realizado numerosos estudios sobre el estudio de la diversidad de los genes *mcy* (especialmente el gen *mcyB*, responsable de la incorporación del primer aminoácido variable). Estos trabajos se han basado en la secuenciación de los genes responsables de la síntesis de las microcistinas en dos cepas de *Microcystis* ((Tillett y col., 2000), (Nishizawa y col., 2000)) y posteriormente en *Anabaena* y *Planktothrix* (Rouhiainen y col., 2004), (Christiansen y col., 2003). El conocimiento de estos genes ha permitido la utilización de cebadores específicos diseñados especialmente para reconocer las zonas conservadas presentes en los dominios de adenilación, llegando a diseñarse cebadores específicos para una única especie productora (Hisbergues y col., 2003) o para estudiar la diversidad genética que estos genes presentan en el ambiente (Rinta-Kanto y Wilhelm 2006). En muchos de los casos la estructura de dominios repetidos, conservados en todos los dominios de adenilación (A1-A10), se han utilizado para diseñar los cebadores utilizados en estos trabajos (Figura III.2).

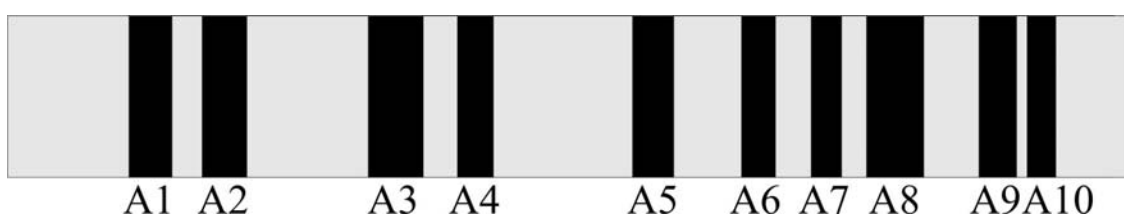


Figura III.2. Estructura de los dominios conservados en los dominios de adenilación. (Extraído de (Konz y Marahiel 1999)). En negro se muestra la situación de las 10 zonas conservadas implicadas en la adenilación del sustrato.

El género productor potencial de microcistinas sobre el cual se han realizado un mayor número de estudios ha sido *Microcystis*, al ser posiblemente el principal productor de microcistinas en el mundo y como hemos visto en el capítulo II en la Comunidad de Madrid. (Via-Ordorika y col., 2004) mostró que existe una relación entre la presencia de genes del operón *mcy* y microcistinas en colonias aisladas de gran parte



de Europa, encontrando que existían diferencias entre las diferentes morfoespecies analizadas, como veremos en el próximo apartado de la introducción.

1.5. Diversidad Cyanobacteria y microcistinas.

En los últimos años y gracias por un lado a la identificación del operón responsable de la producción de microcistinas y por otro a la aplicación de la técnica de Maldi-tof se ha podido iniciar el estudio de la producción de microcistinas a nivel de colonia (Fastner y col., 2001), esto ha permitido identificar diferencias de producción entre distintas especies de *Microcystis* e incluso diferenciar clones dentro de la misma especie.

Estos análisis, han mostrado que se pueden encontrar tanto situaciones en las que existen varias especies productoras simultáneamente, como otras en las que aparece una especie, pero con diversos clones. Respecto a la probabilidad que presentan las especies de *Microcystis* de producir microcistinas se han publicado dos trabajos fundamentales. Estos dos trabajos fueron: uno, el trabajo que puede considerarse el inicio este tipo de estudios (Fastner y col., 2001) que analizó la población de *Microcystis* en el lago Wannsee, Alemania y otro posterior en el cual se estudiaron multitud de colonias de *Microcystis* procedentes de 13 lagos localizados en 9 países (Via-Ordorika y col., 2004). Los resultados obtenidos fueron similares, en la mayor parte de las colonias de la especie *M. aeruginosa* (el 75% en el trabajo de (Via-Ordorika y col., 2004) y el 98% en (Fastner y col., 2001)) se detectaron microcistinas. En el extremo contrario nos encontramos la especie *M. wessenbergii* de la cual no han se han encontrado estirpes productoras de microcistina en Europa. Entre estos dos extremos nos encontramos al resto de las especies del género *Microcystis*: *M. flos-aquae* y *M. panniformis* con valores de alrededor del 50% y *M. ichthyoblabe* y *M. viridis* que presentan valores alrededor del 20% (Via-Ordorika y col., 2004).

Otro resultado interesante, en el que únicamente se consideró la especie *M. aeruginosa* (Wilson y col., 2005), fue la comprobación de la existencia de una elevada



diversidad dentro de esta especie, encontrando una variabilidad de producción del 79% en las cepas analizadas, siendo mayor la diversidad encontrada dentro de un lago, que la que se encuentra entre los diferentes embalses analizados.



2. Objetivos

Los afloramientos tóxicos no suelen ser monoespecíficos e incluso se ha observado la existencia de una importante diversidad dentro de la misma especie de cianobacteria potencialmente tóxica. Los objetivos de este capítulo son:

- ⇒ Analizar la presencia de diferentes tipos de microcistinas en el embalse de Santillana en el año 2002
- ⇒ Correlacionar los cambios en la concentración y tipos de microcistinas que aparecen con cambios morfológicos y genéticos en la población de especies potencialmente tóxicas encontradas en cada momento.
- ⇒ Correlacionar las sucesiones de cianobacterias con los parámetros ambientales.



3. Materiales y Métodos.

3.1. Zona de Estudio.

La zona de estudio fue el embalse de Santillana descrito ya en el capítulo I.

3.2. Toma de muestras.

Durante el año 2002 se analizó el embalse objeto de estudio, durante el periodo típico de aparición de afloramientos tóxicos en los países templados del hemisferio Norte, de junio a noviembre.

Se tomaron muestras de la fracción sestónica según la metodología ya descrita en el capítulo I . Las muestras se guardaron a 4 °C hasta su procesamiento, típicamente antes de cuatro horas, en botes de polipropileno de boca ancha y lavados con ácido clorhídrico.

3.3. Análisis de especies cianobacterianas planctónicas potencialmente tóxicas presentes en el embalse de Santillana, extracción y análisis de microcistinas y análisis de parámetros ambientales.

Las muestras se procesaron y analizaron como se ha descrito en el capítulo I. La identificación de las especies cianobacterianas presentes se realizó según los criterios definidos por los siguientes autores ((Geitler 1932), (Komarek y Anagnostidis 1989; 1999; Komarek y Anagnostidis 1986)).

La extracción y análisis de microcistinas se realizó como se ha descrito en el capítulo II, mientras que los parámetros químicos, físicos y biológicos se analizaron como se ha descrito en el Capítulo I, finalmente los parámetros atmosféricos: precipitación, temperatura, racha de viento máxima, horas de insolación y porcentaje de la insolación máxima teórica se



obtuvieron de la estación meteorológica del Instituto Nacional de Meteorología situado en la base aérea de Colmenar Viejo/FAMET, a menos de 15 km del punto de muestreo.

3.4. Amplificación del gen *mcyB*, y análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción.

Las muestras de agua fueron filtradas a través de filtros GF/F y mantenidas a -20°C hasta su análisis. Para la extracción de ADN se cortaron los filtros y se les añadió Tris-HCl 1 M (pH = 7), 10 mg de lisozima, la mezcla se incubó durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. A continuación, se añadió 1 mL de buffer de extracción (120 mM de tampón fosfato pH = 8, EDTA 0,1 M, ClNa 1,5 M, CTBA 1% y proteinasa K 10 mg mL⁻¹), y se incubó a 65 °C durante 1 hora. Después se añadieron 75 µL de tiocianato de guanidina y 200 µL de SDS 10%, 1 minuto de agitación, 2 minutos en un baño de ultrasonidos Ultrasons (J.P.Selecta, España). Finalmente se sometió a tres ciclos de congelación (-80 °C) y descongelación (37 °C). Se recuperó la mayor cantidad de líquido posible y se extrajo el filtro dos veces más con 1,5 mL adicionales de tampón fosfato (120 mM pH = 8). El líquido obtenido se extrajo con un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), y posteriormente con otro volumen de cloroformo-isoamílico (24:1). La fase acuosa se precipitó a -80 °C durante una hora con un volumen de isopropanol y 0,4 volúmenes de cloruro sódico 5M. Finalmente se lavó con etanol 100% (-20 °C) y dos veces con etanol 70% (-20 °C).

El ADN obtenido se utilizó para amplificar una zona de dominio de adenilación de gen *mcyB*. Los cebadores utilizados fueron los descritos por (Kurmayer y col., 2002) (Tabla III.1), éstos son específicos para el género *Microcystis*, único organismo potencialmente productor presente durante el periodo analizado. El fragmento obtenido fue de 1321 pb e incluye las zonas conservadas de A3-A10. La amplificación fue realizada en un volumen de 50 µL al que se le añadieron 5 µL de PCR buffer, 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de deoxinucleótidos (10 mM), 2 µL de polimerasa Tth (biotools, España), 2 µL de cada uno de los cebadores (concentración final 10 pmol), 34 µL de agua estéril y 4 µL de la extracción de ADN. Para la amplificación se utilizó un termociclador PCR (Perkin- Elmer GenePCR systems 2400,



EEUU) y se realizó, al igual que el análisis de restricción, siguiendo las condiciones descritas por (Kurmayer y col., 2002).

Nombre	Secuencia	T _m
Tox4f	5'-GGATATCCTCTCAGATTCGG-3'	57°C
Tox4r	5'-CACTAACCCCTATTTTGGATACC-3'	59°C

Tabla III.1. Cebadores utilizados y temperatura de anillamiento (T_m).

3.5. Análisis de Maldi-Tof.

Para este análisis se seleccionaron un número de colonias pertenecientes a la especie *Microcystis aeruginosa* provenientes de afloramientos del embalse de Santillana y se analizaron los péptidos presentes en ella por medio de Maldi-Tof. Para ello se utilizó un Maldi-Tof de la marca Broker, y se siguió el protocolo descrito por (Fastner y col., 2001). Brevemente, se seleccionaron colonias de distinto tamaño, se lavaron tres veces con agua filtrada del embalse o con medio estéril, en función de dónde habían sido recogidas y se pusieron directamente sobre placas de muestras de Maldi-Tof; cuando se secó el medio que llevaban se añadieron a cada colonia 3 µL de una mezcla de Acetonitrilo/Agua (50:50) más 0,03% de TFA al que se le añadía una concentración de 10 mg de ácido 2,5-dihidroxibenzoico por mL. Esta mezcla actuó simultáneamente como extractante y como matriz. El análisis de Maldi-Tof se realizó en modo de ión positivo y se obtuvieron los espectros entre una relación masa-carga (m/z) de entre 500 y 1500, región donde pueden detectarse muchos de los péptidos producidos por las cianobacterias.

Para detectar cuál era el tamaño de las colonias que podían ser utilizadas para este tipo de análisis, se realizó una prueba utilizando un cultivo de *Microcystis* que mantenía la capacidad de formar colonias, *Microcystis aeruginosa* UAM 247. Se seleccionaron 14 colonias de diferente tamaño y se analizaron los péptidos que se detectaban en cada caso. La presencia de la colonia en la placa se confirmó bajo observación en lupa binocular (Leica MZ7.5m, Reino Unido).



3.6. Realización de análisis químio-taxonómico.

Se seleccionaron colonias mediante lupa binocular pertenecientes al genero *Microcystis* y se realizaron tres lavados por agua destilada, posteriormente se midieron las colonias y se fotografiaron mediante un microscopio Olympus BH-2 (Alemania) con una cámara digital Leica 300F(Reino Unido) y se calculó el área de cada colonia con el programa de análisis de imagen Qwin de Leica. Posteriormente se analizaron los péptidos presentes en esas colonias como ha sido descrito en el punto anterior

Para realizar los árboles químio-taxonómicos se seleccionó una región del espectro de masas entre 900 y 1100 de relación m/z En ese rango se realizó una detección de todos los posibles compuestos diferentes, se determinó la intensidad de cada uno de ellos y se relativizaron las intensidades de cada uno de los picos respecto a la suma total de intensidades obtenidas en la zona entre 900 y 1100. Una vez obtenidas las relaciones para cada una de los picos se construyó una matriz para cada una de las colonias y el conjunto de matrices se analizó realizando una clasificación ascendente jerárquica. Para ello se obtuvo una matriz de distancias entre las diferentes colonias calculando el grado de similitud entre ellas mediante el coeficiente de similitud de Pearson. Una vez obtenida la matriz de distancias se construyó un árbol mediante el método de aglomeración de enlace medio. Para todos estos cálculos se utilizó el programa XLSTAT 2006 Versión 2006.2.



4. Resultados.

Durante el año 2002 observamos que en el embalse de Santillana se produjo un cambio en el patrón de toxinas que aparecía en las muestras a lo largo del periodo analizado. Este cambio no afectó a la toxina mayoritaria que fue la Mc-LR, pero la toxina acompañante cambió de Mc-YR a Mc-RR. Este cambio se observó tanto en las muestras concentradas como en las no concentradas (capítulo II), si bien el cambio en el patrón de toxina producida fue mucho más claro en las muestras no concentradas, donde el número de toxinas minoritarias disminuye al ser menor la cantidad de microcistina total presente. En este capítulo se analizará si estos cambios fueron debidos a un cambio en la cepa mayoritaria presente en cada momento o a un cambio de toxina producida por factores ambientales que afectaron a la especificidad de la péptido-sintetasa por los aminoácidos que reconocía, especialmente el *mcyB*, enzima encargada de la incorporación del segundo aminoácido variable que es el que sufre la modificación química.

4.1. Determinación del tamaño mínimo de la colonia de Microcystis necesaria para el análisis de Maldi-Tof.

Se seleccionaron colonias de diferente tamaño de la cepa *M. aeruginosa* UAM 247 y se analizaron por Maldi-Tof como se ha descrito en materiales y métodos. El número de células constituyentes de la colonia se obtuvo de forma aproximada puesto que la estructura tridimensional que presentan las colonias de este organismo y su gran densidad de células impide contarlas sin destruir la morfología colonial. El hecho de utilizar colonias y no cultivos unicelulares de *Microcystis* (que podrían ser contadas con facilidad) fue un intento de simular las condiciones que se encuentran en una situación de campo, donde no es posible disgregar las colonias, y para mantener la especificidad respecto al morfotipo analizado o incluso de cepa que esta técnica tan sensible permite. Los resultados obtenidos muestran que salvo en la colonia de menor tamaño, en el resto fue posible identificar las microcistinas mayoritarias producidas por este organismo (Mc-LR, Mc-YR), así como otras numerosas moléculas que pudieran ser ionizadas por este método (Tabla III.2).



Tamaño aproximado (n° de células)	N° de microcistinas mayoritarias detectadas	N° de otras posibles microcistinas detectadas	Picos totales detectados
10-50	0	0	8
20-60	2	6	31
20-60	2	9	30
20-60	2	5	27
100-200	2	7	36
100-200	2	7	32
200-400	2	6	26
500-1000	2	6	27
500-1000	2	9	36
500-1000	2	10	47
> 3000	2	7	53
> 3000	2	5	71
> 3000	2	7	45
> 3000	2	7	56

Tabla III.2: Análisis de Maldi-Tof de colonias en función del tamaño de la colonia. Se muestran tanto el tamaño aproximado en número de células, número de microcistinas mayoritarias detectadas (Mc-LR y Mc-YR) y número total de posibles microcistinas detectadas.

Los resultados obtenidos indican que es posible detectar la presencia de microcistinas en colonias de muy pequeño tamaño (entre 20 y 60 células) lo que representa a colonias de unos 200 μm de diámetro, con las colonias pequeñas (20-60 células) los resultados obtenidos no fueron homogéneos en todo el pocillo de la placa de Maldi-Tof. En este caso, para detectar microcistinas fue necesario bombardear con el láser directamente la colonia (Figura III.3), mientras que no fue posible detectar su presencia al ionizar la matriz en otras zonas de la muestra. Aunque a excepción de un caso, fue posible identificar la presencia de microcistinas, sin embargo parecen existir ligeras diferencias tanto en el número de péptidos totales, que es mayor cuanto mayor es el número de células que se utilizan para el análisis, como en la reducción de la relación señal/ruido especialmente en la zona con pesos moleculares entre (500 y 800) y finalmente en la intensidad total que presentan los picos detectados (Figura III.4). Cuando analizamos el número de picos que aparecen en la muestra y que presentan una masa similar a la de alguna de las microcistinas conocidas según (Sivonen y Jones 1999), lo que podemos denominar “otras posibles microcistinas” observamos que no existen diferencias significativas en el número de toxinas detectadas entre las colonias de diferentes tamaños,



posiblemente debido a la importante desviación existente en el número de toxinas detectadas en las muestras (Tabla III.2)

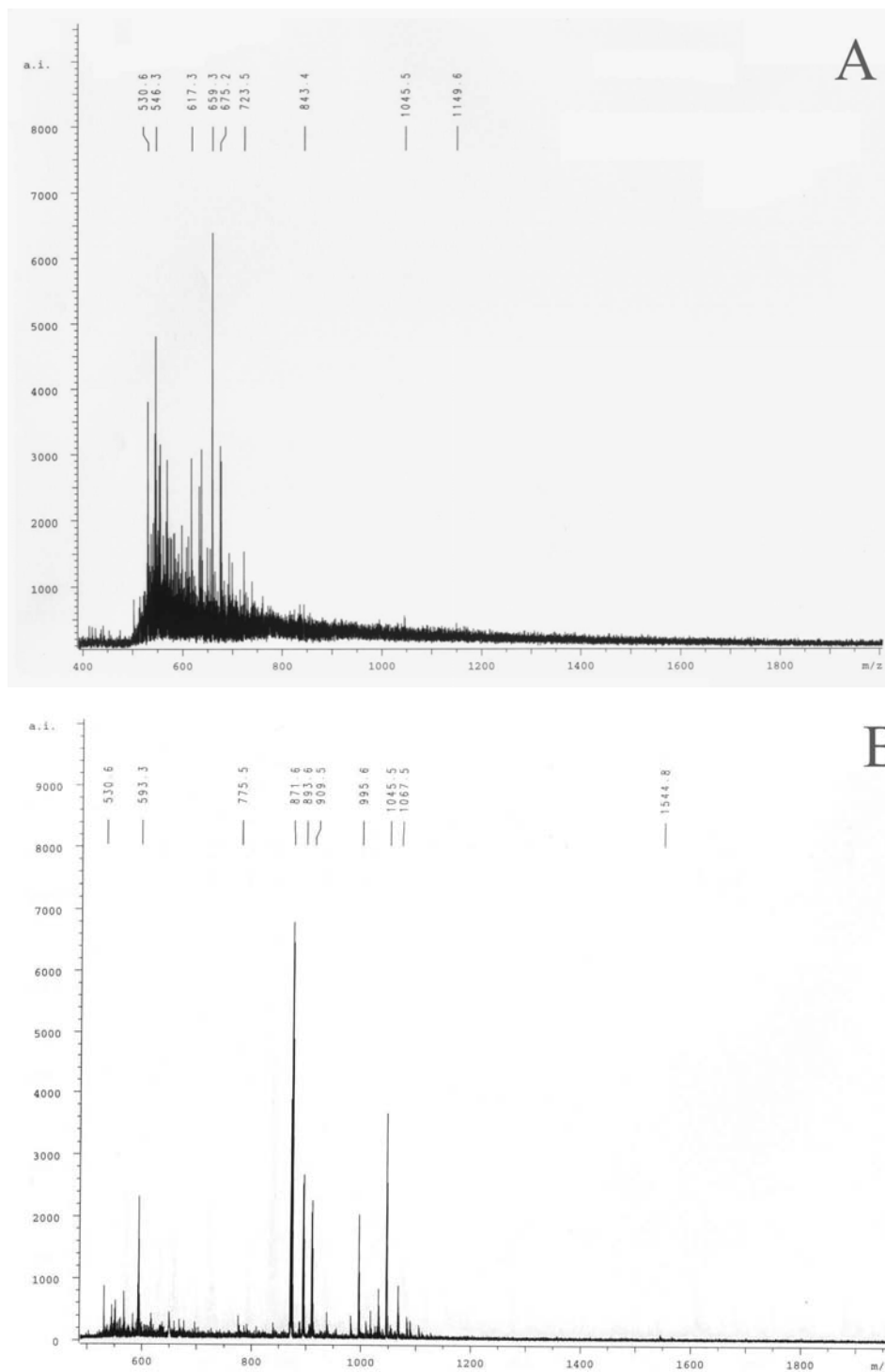


Figura III.3. Espectros de Maldi-Tof típico de las muestras de un tamaño de entre 20-60 células. A ionización de la matriz, B ionización directa de la colonia.

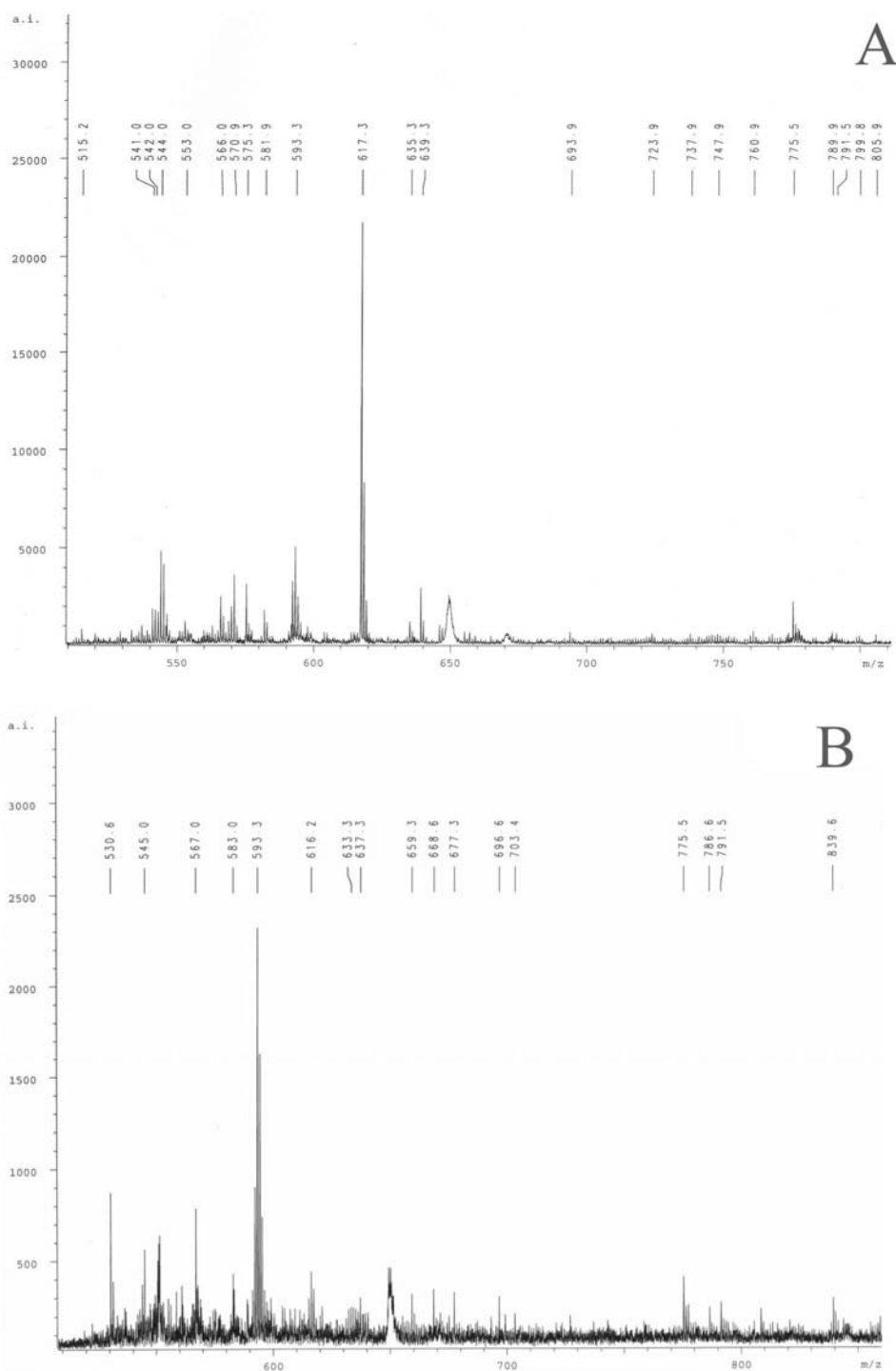


Figura III.4. Espectros de Maldi-Tof típico de la región entre 500 y 800 de la relación m/z. A espectro de la colonia típica con un tamaño entre 500-800 células, B espectro de la colonia típica con un tamaño entre 20-60 células.



4.2. Análisis de Microcistinas por HPLC.

Como ya hemos visto en el año 2002 se detectó microcistina en la fracción sestónica del embalse de Santillana entre los meses de septiembre y noviembre (ver capítulo II). El análisis en profundidad de los tipos de microcistinas detectadas nos permitió confirmar que no existían grandes diferencias entre los dos puntos de muestreos situados en lados opuestos del embalse: S1 que se analizó en todos los muestreos realizados y S2 que se analizó en cuatro ocasiones, tres en el mes de septiembre y otra en el mes de octubre (momentos en los que la concentración de cianobacterias fue elevada), salvo para el día 12 de julio en el cual un la presencia de un pico que interfería con la determinación de la microcistina YR no permitió su correcta detección en punto S1, y si en el punto S2.

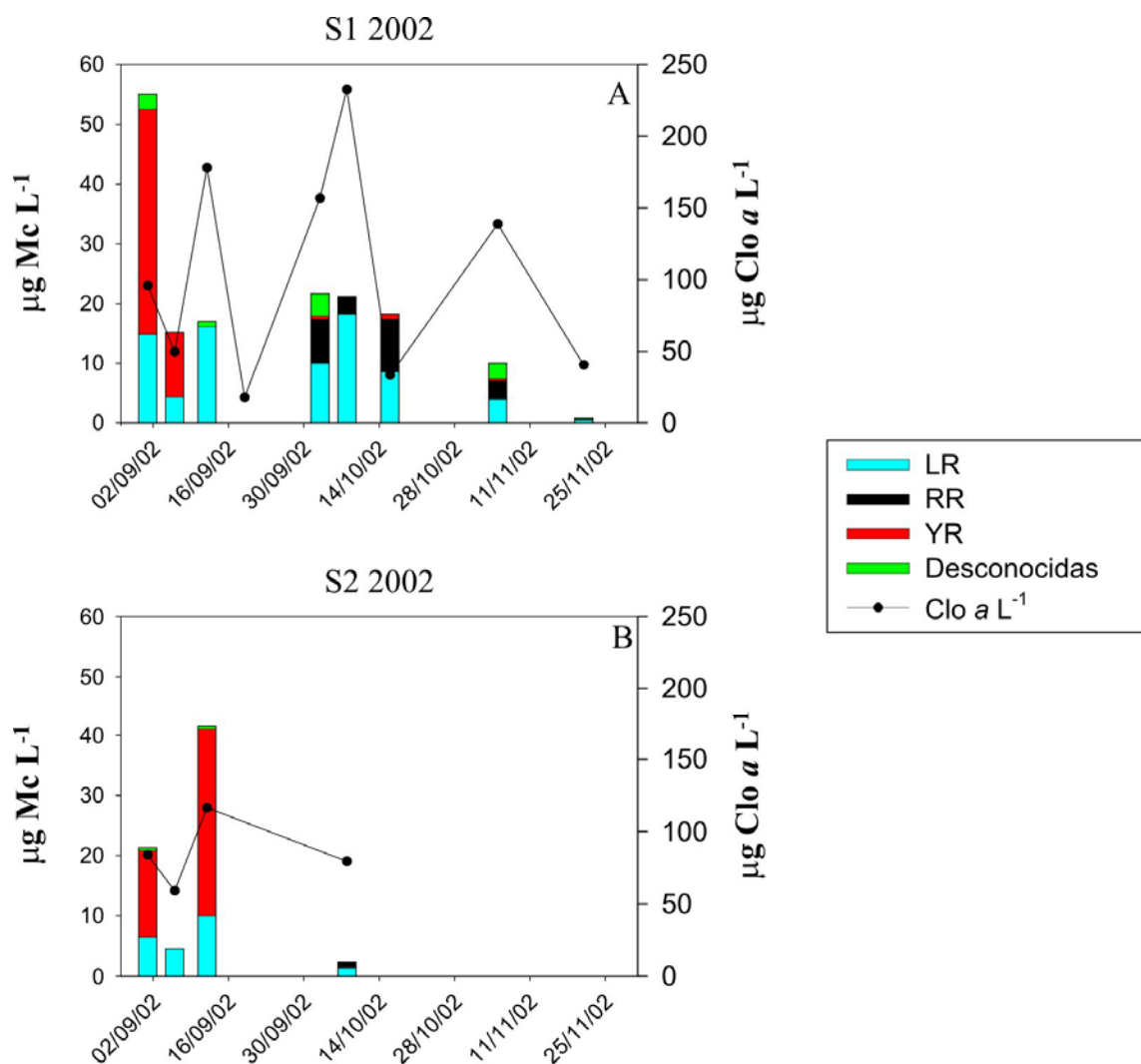


Figura III.5. Tipos de microcistinas presentes en el embalse de Santillana en el año 2002 y concentración de clorofila *a*.



En todos los momentos analizados de los meses de septiembre a noviembre, salvo en uno de los muestreos, fue posible detectar microcistinas y en aquellos en los que se detectaron estos péptidos, menos en el ultimo muestreo, las concentraciones detectadas fueron superiores a 1 µg de microcistinas por litro y se observó un cambio en la variante de microcistinas producida (para mas información ver capítulo II).

4.3. Especies cianobacterianas planctónicas presentes.

La población de cianobacterias planctónicas del embalse de Santillana durante todo el periodo en el cual fue posible detectar microcistinas estuvo dominado por dos géneros (Figura III.6): *Microcystis* y *Aphanizomenon* (para más información referente al resto del año ver capítulo I). En cuatro momentos diferentes, aparte del punto usual de muestreo, se obtuvieron muestras de otro punto situado en el lado opuesto del embalse (S2), con el fin de obtener una visión más general de lo que estaba ocurriendo en el embalse sin estar influidos por las acumulaciones de cianobacterias producidas por el viento. Durante todo el periodo analizado, excepto el 19 de septiembre en el que *Aph. flos-aquae* fue mayoritario, *M. aeruginosa* dominó la población de cianobacterias potencialmente tóxicas llegando a ser la única cianobacteria planctónica detectada por análisis microscópico a mediados del mes de septiembre.

Cuando comparamos los datos obtenidos en los dos puntos de muestreo podemos (Figura III.5) observar que no existen grandes diferencias en los tipos de especies encontradas, salvo el día 12 de septiembre en el cual no se detectó microcistina YR en el punto S1 y si en el S2, lo que fue debido a un compuesto que presentó el mismo tiempo de retención que la Mc-YR en el punto S1 interfiriendo en la determinación. En cuanto a los porcentajes en los que se encuentran, éstos son también casi idénticos existiendo pequeñas diferencias en una de las fechas analizadas, pero sin que esto afecte a cuál es la especie dominante, que en todos los casos fue la misma a ambos lados del embalse, *Microcystis aeruginosa*.

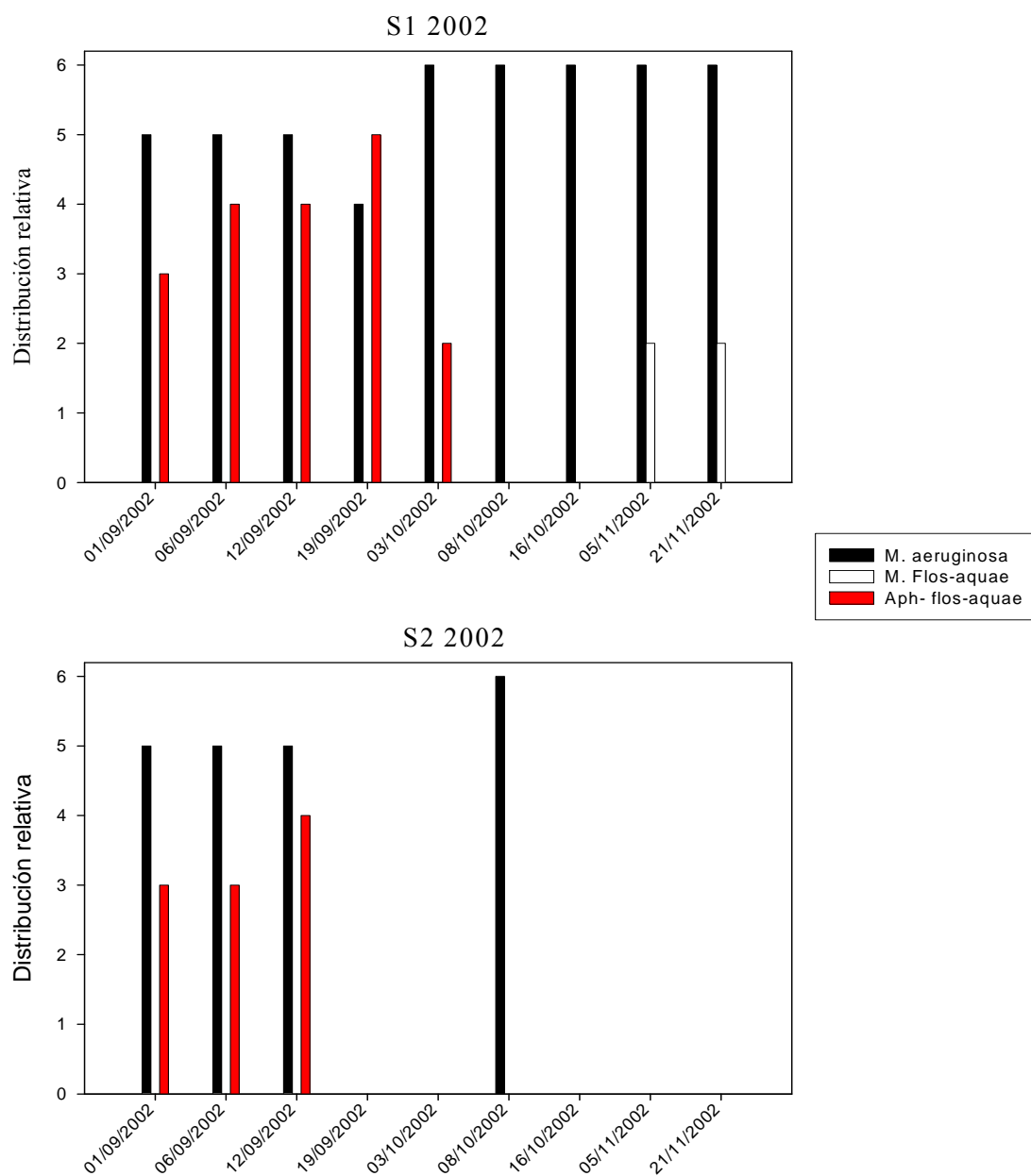


Figura III.6. Especies de cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas presentes en el embalse de Santillana entre los meses de septiembre y noviembre del año 2002. La distribución relativa fue definida como sigue: 0, ausente; 1, < 1%; 2, 1-10%; 3, 11-25%; 4, 26-50%; 5, 51-75%; 6, 75-100%.



4.4. Relación entre los tipos de microcistinas observadas y los parámetros ambientales.

Con el fin de estudiar si existe una relación entre los tipos de microcistinas observadas y los parámetros ambientales se realizó un análisis de correlación múltiple entre las concentraciones de microcistinas y diversos parámetros biológicos y ambientales. Estos últimos fueron: concentración de clorofila-a, abundancia de las tres especies de cianobacterias presentes (*M. flos-aquae*, *M. aeruginosa* y *Aph. flos-aquae*), fósforo total, nitrato, nitrito, amonio, nitrógeno inorgánico disuelto, relación entre fósforo total y nitrógeno inorgánico disuelto, oxígeno disuelto, pH, conductividad, turbidez, temperatura del agua, temperatura media del aire en los últimos tres y siete días, precipitación en los últimos tres y siete días, horas de insolación y porcentaje de insolación sobre la máxima teórica los últimos tres y siete días y por último racha de viento máximo en los últimos tres y siete días. Como entre los datos analizados encontramos tanto parámetros cuantitativos, cualitativos como semicuantitativos se realizaron dos tipos de correlaciones: las variables cuantitativas se correlacionaron mediante el método de Pearson Tabla III.4. y para las correlaciones de los parámetros cualitativos, semicuantitativos y sus interacciones con los parámetros cuantitativos se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman Tabla III.5.

En las Tablas III.4. y III.5, podemos observar que la presencia de microcistina total se correlaciona positivamente con la presencia de *M. aeruginosa* y negativamente con la presencia de *M. flos-aquae*. En ambos casos los valores de correlación fueron elevados y significativos. Por otro lado, además de con estas dos especies de cianobacterias la concentración total de microcistinas presentó correlaciones significativas con la relación fósforo total - nitrógeno inorgánico disuelto y con los tipos de microcistinas LR e YR. En cuanto a la presencia de microcistinas además de presentar correlaciones con las dos especies de cianobacterias y las variantes de microcistinas, también se correlacionó positivamente con la turbidez, negativamente con la temperatura y la velocidad media de la racha de viento máximo en los últimos 7 días. Respecto a como se correlacionaron las diferentes variantes de microcistinas, podemos observar por un lado que la presencia de Mc-LR se correlaciona positivamente con la concentración de clorofila, la abundancia de *M. aeruginosa*, con la



turbidez y la media de temperatura atmosférica en los últimos 7 días, y negativamente con la presencia de *M. flos-aquae*. La concentración de este tipo de microcistina se correlacionó sin embargo con el fósforo total y con el pH. La presencia de Mc-RR se encuentra positivamente correlacionada con la concentración de nitrato, nitrógeno inorgánico disuelto y la abundancia de *M. aeruginosa*, y negativamente con la mayoría de los parámetros atmosféricos analizados y con la presencia de *Aph. flos-aquae*. La concentración de Mc-RR estuvo influida positivamente con la concentración de nitrógeno inorgánico y negativamente por el viento en los anteriores tres días. Finalmente la presencia de la última variable mayoritaria encontrada en este embalse, la Mc-YR sólo presentó correlación con la toxina total y con las variantes YR y LR, mientras que su concentración estuvo influida por la relación NID-Ptot.

VARIABLES	Concentración Mc-total	LR	RR	YR
Clorofila	0,434	0,815	0,230	0,070
Toxina	-	0,739	0,108	0,874
LR	0,739	-	0,271	0,374
RR	0,108	0,271	-	-0,264
YR	0,874	0,374	-0,264	-
P-total	0,377	0,802	0,155	0,028
Nitrato	-0,077	0,171	0,461	-0,345
Amonio	-0,464	-0,357	0,232	-0,456
Nitrito	0,071	0,480	0,161	-0,177
N-inorg.	-0,226	0,107	0,521	-0,505
N-inorg/Ptot.	0,806	0,436	-0,270	0,872
Temp. agua	0,157	0,150	-0,465	0,281
pH.	0,516	0,546	0,097	0,387
Conductividad	0,125	0,190	-0,339	0,159
OD mg.	0,083	0,204	0,021	0,002
Turbidez	0,456	0,562	0,359	0,246
Precipitación(7 días)	-0,120	0,166	0,280	-0,323
Precipitaciones (3 días)	-0,158	-0,154	0,351	-0,256
Temp. media (7 días)	-0,033	-0,149	-0,413	0,145
Temp. media (3 días)	0,113	-0,014	-0,420	0,272
Media Horas de sol (7 días)	0,181	0,003	-0,383	0,339
Media Horas de sol (3 días)	0,229	0,198	-0,507	0,363
% insolación max. (7 días)	0,284	0,120	-0,274	0,382
% insolación max. (3 días)	0,293	0,297	-0,467	0,390
Media Viento max. (7 días)	-0,016	-0,308	-0,481	0,282
Media Viento max. (3 días)	0,049	-0,272	-0,614	0,364

Tabla III.4: Tabla de correlaciones paramétricas entre la microcistina total y los tipos de microcistinas y los parámetros biológicos, físicos y ambientales. Se ha realizado el coeficiente de correlación de Pearson. En negrita los valores de correlación que presentan diferencias significativas con un $p \leq 0,05$. Abun = abundancia. Temp. = temperatura



	Presencia toxina	Presencia LR	Presencia RR	Presencia YR
Clorofila	0,434	0,626	0,280	0,287
Presencia toxina	1,000	0,832	0,372	0,424
Toxina	0,630	0,757	0,141	0,730
Presencia LR	0,832	1,000	0,447	0,509
LR	0,630	0,757	0,197	0,427
Presencia RR	0,372	0,447	1,000	0,098
RR	0,359	0,432	0,965	0,236
Presencia YR	0,509	0,098	0,920	1,000
YR	0,445	0,535	0,000	0,920
P-total	0,354	0,497	0,107	0,215
Nitrato	0,308	0,229	0,672	-0,043
Amonio	0,174	0,000	0,337	-0,246
Nitrito	0,229	0,276	0,616	-0,100
N-inorg.	0,330	0,250	0,700	-0,096
N-inorg /Ptot.	0,000	0,078	-0,280	0,055
Abun. <i>M. flos-aquae</i>	-0,786	-0,612	-0,034	-0,351
Abun. <i>M. aeruginosa</i>	0,551	0,662	0,888	0,318
Abun. <i>Aph. flos-aquae</i>	0,073	-0,180	-0,777	0,071
Temp. agua	-0,463	-0,349	-0,818	-0,124
pH.	-0,154	0,070	-0,164	0,186
Conductividad	-0,424	-0,164	-0,463	0,016
OD mg.	-0,039	0,140	0,327	-0,031
Turbidez	0,634	0,624	0,244	0,495
Precipitación(7 días)	0,018	-0,095	0,538	-0,428
Precipitaciones (3 días)	0,198	-0,032	0,145	0,212
Temp. media (7 días)	-0,679	-0,628	-0,843	-0,206
Temp. media (3 días)	-0,540	-0,440	-0,843	-0,096
Media Horas de sol (7 días)	-0,331	-0,157	-0,758	0,206
Media Horas de sol (3 días)	-0,192	0,031	-0,646	0,014
% insolación max. (7 días)	-0,261	-0,094	-0,758	0,233
% insolación max. (3 días)	-0,087	0,126	-0,562	0,014
Media Viento max. (7 días)	-0,540	-0,408	-0,758	0,041
Media Viento max. (3 días)	-0,401	-0,377	-0,786	-0,123

Tabla III.5: Tabla de correlaciones paramétricas entre la microcistina total y los tipos de microcistinas y los parámetros biológicos, físicos y ambientales. Se ha realizado el coeficiente de correlación de Spearman. En negrita los valores de correlación que presentan diferencias significativas con un $p \leq 0,05$. Abun. = abundancia. Temp. = temperatura

4.5. Análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción.

En paralelo a la toma de muestras para el análisis de microcistinas se tomaron muestras para analizar la diversidad del gen *mcyB*. Cuando analizamos el perfil de fragmentos de restricción (Figura III.7) podemos observar que existe un cambio brusco en el patrón de fragmentos de restricción que coincide con el cambio en el tipo de microcistinas producida.



En un primer momento, 6 de septiembre la población estuvo dominada por un tipo del gen *mcyB* que presenta un fragmento de restricción similar al que presenta la cepa de *M. aeruginosa* UAM 247 que producía como microcistinas mayoritarias a Mc-LR y Mc-YR. Tras un pequeño periodo en el que pudo verse la presencia tanto de una parte del gen sin digerir como de otra digerida por la enzima de restricción, se pasó a una situación final 3 de octubre que estuvo completamente dominada por una variante del gen *mcyB* que no resultó digerida y que fue similar a la cepa de *M. aeruginosa* UAM 245 que presentó como microcistinas mayoritarias Mc-LR y Mc-RR.

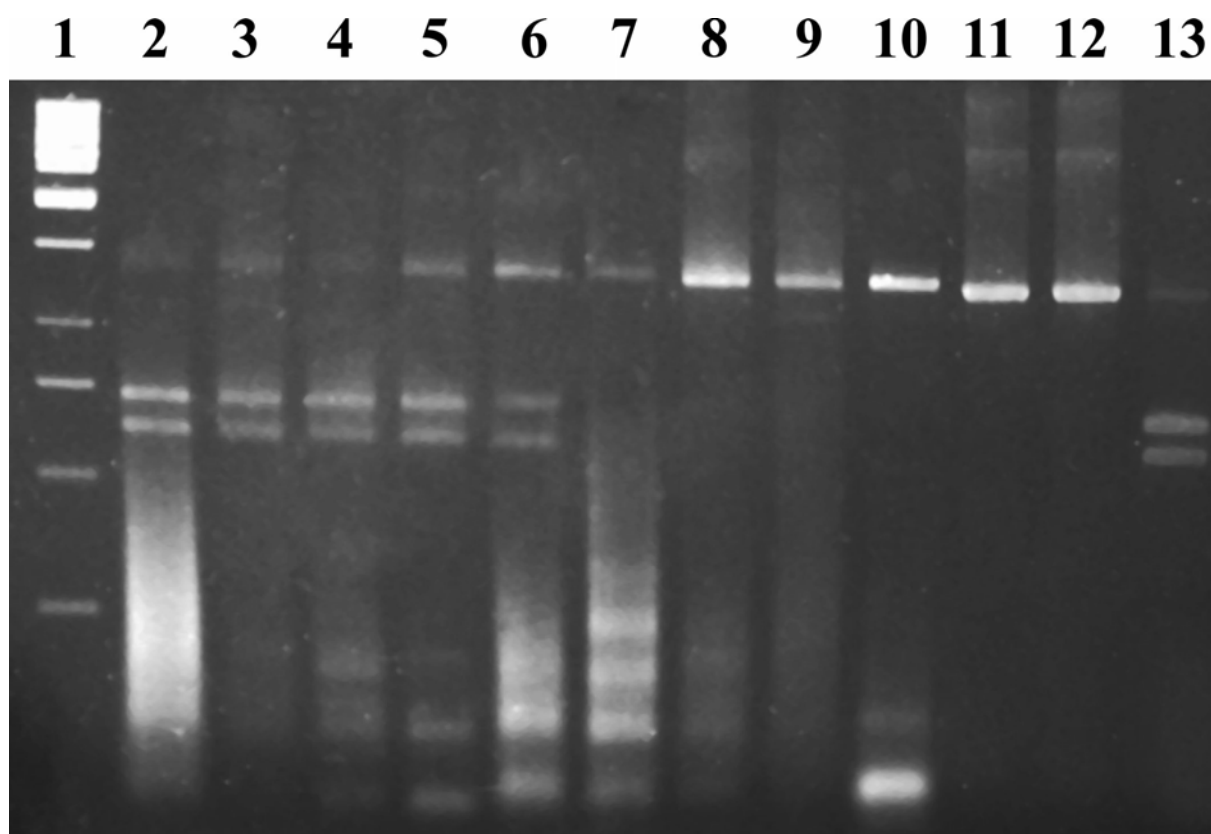


Figura III.7 Análisis de restricción del fragmento de *mcyB*. Calle 1 patrones de peso molecular, calles de 2 a 10 muestras de Santillana por orden 20-8-02, 1-9-02, 6-9-02, 12-9-02 punto S1 y 12-9-02 punto S2, 19-9-02, 3-10-02, 8-10-02, 16-10-02, 5-11-02, 21-11-02. La calle 12 presenta el fragmento del gen *mcyB* perteneciente a la cepa *M. aeruginosa* UAM (245), calle 13 fragmento del gen *mcyB* de la cepa de *M. aeruginosa* UAM (247).



4.6. Tipos de microcistinas presentes en colonias de *M. aeruginosa* analizadas por Maldi-Tof.

Se realizaron análisis de Maldi-Tof sobre colonias individuales de *Microcystis aeruginosa* en dos fechas diferentes en el embalse de Santillana. En un primer análisis se analizaron 12 colonias recogidas en el muestreo realizado el día 6 de septiembre, posteriormente el día 12 de ese mismo mes se seleccionaron 48 colonias más. Los resultados obtenidos de los tipos de microcistinas que presentaban (tabla III.6) muestran que la mayor parte de la población del embalse presentaba colonias productoras de las variantes YR y LR, este momento coincide con las semanas anteriores al cambio en las microcistinas mayoritarias producidas lo que indica que existe una gran homogeneidad en los tipos de microcistinas que son producidas en estos momentos. Este valor es muy significativo en el segundo muestreo realizado, donde el número de colonias fue mayor lo que permite llegar a conclusiones más fiables. En total más del 90% de las colonias analizadas presentaron como principales microcistinas detectadas (aquellas que presentaban una señal más fuerte en el espectro de masas) las microcistinas YR y LR (en ninguna de estas colonias fue posible identificar ningún ión que correspondiera la microcistina RR) siendo en total tres las colonias que presentaron como microcistinas mayoritarias los tipos LR y RR y sólo dos las que no presentaron ningún tipo de microcistinas. Cabe destacar que las colonias que presentaron Mc-RR y Mc-LR también presentaban una señal pequeña perteneciente a la Mc-YR.

Día de muestreo	Nº de Colonias analizadas	% colonias YR-LR	% colonias RR-LR	% colonias Sin Mc
6-9-2002	12	83,3	16,7	0
12-9-2002	48	91,7	2,1	6,3
Total	60	90	5	5

Tabla III.6: Porcentaje de colonias que presentaron como microcistinas mayoritarias YR-LR, RR-LR o ninguna en el embalse de Santillana, en los muestreos previos al cambio poblacional.



La técnica de Maldi-Tof no puede considerarse cuantitativa, porque los diferentes compuestos no tienen porque ionizarse con la misma eficiencia, aun teniendo esto en cuenta parece curioso señalar que las relaciones entre la señal del pico perteneciente a la microcistina YR y a la microcistina LR en las colonias en las que estas dos toxinas fueron mayoritarias, se observaron valores muy similares entre el primer y el segundo día con valores de $0,714 \pm 0,07$ y $0,648 \pm 0,08$ respectivamente. Desafortunadamente la falta de datos de Maldi-tof después del cambio cepa productora como ocurre para las variaciones vistas por HPLC.

4.7. Diversidad de las colonias de *M. aeruginosa* en un afloramiento masivo.

Los estudios de Maldi-Tof, no sólo permiten identificar la presencia de productores de microcistinas sino que también pueden permitir identificar posible quimio-especies, para ello los espectros de masas obtenidos de las colonias de *M. aeruginosa* tanto en laboratorio como en campo fueron utilizados para analizar la diversidad de cepas de *M. aeruginosa* que se presentaron durante el desarrollo del afloramiento analizado.

Cuando analizamos el número de picos presentes en las muestras estudiadas podemos observar que existen diferencias entre las distintas colonias, diferencias que pueden deberse a una mayor intensidad de la señal, existiendo una correlación positiva entre la cantidad de picos detectados y la intensidad total de la muestra, a mayor intensidad, se observa un mayor número de picos (Figura III.7). Por otro lado se podrían pensar que el incremento en la intensidad podría ser debido a un mayor tamaño de la colonia pero como podemos ver en la (Figura III.7) no existe ninguna correlación entre el tamaño y la intensidad de señal observados. Esta diferencia entre la cantidad de picos observados parece recomendar la realización de un análisis semi-cuantitativo, y no sobre la presencia/ausencia de los diferentes picos, para realizar el árbol de similitudes de las colonias analizadas, en el cual se relativiza la intensidad de cada pico respecto a la intensidad de todos los picos observados en la región de relación m/z entre 900 y 1100.

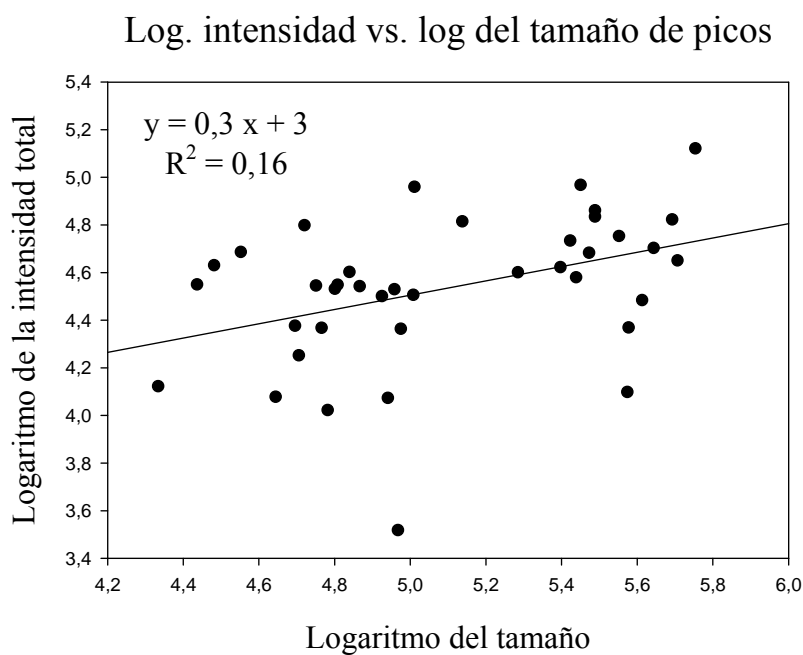
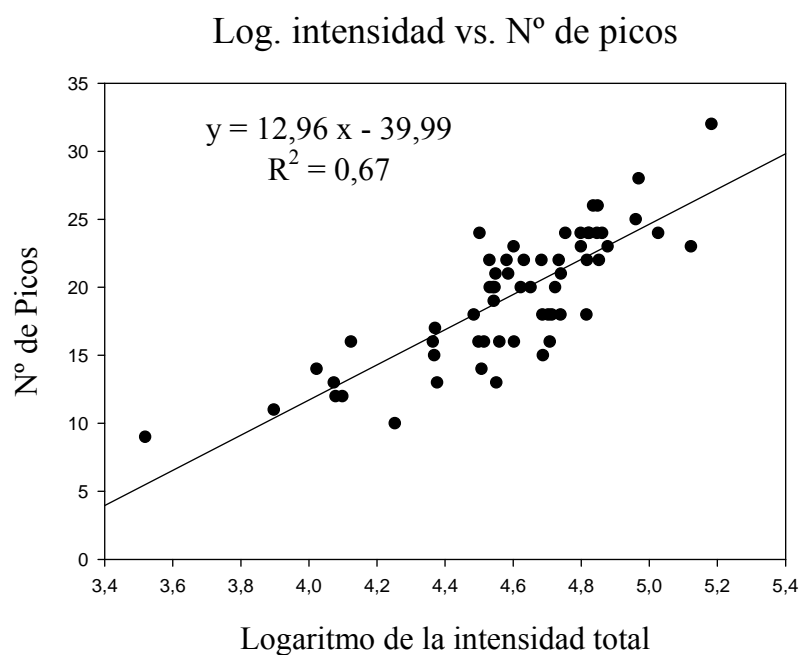


Figura III.7. Correlación entre los picos detectados y la intensidad de señal, y de la intensidad y el tamaño. Número de picos detectados entre la relación m/z 900 y 1100 en las diferentes colonias de campo analizadas y el logaritmo de la intensidad total obtenida en esa región, y el logaritmo del tamaño de la colonia contra el logaritmo de la intensidad total.



Antes de realizar el árbol quimio-taxonómico, y puesto que no existe un consenso acerca de cual es la similitud respecto a los análisis de Maldi-Tof que presenta una cepa de *M. aeruginosa* se realizó un árbol con 14 colonias aisladas de un cultivo monoclonal con el fin de ver cual podría ser la variabilidad intra-cepa. La Figura III.8 muestra la similitud obtenida, en ella podemos observar la aparición de tres grandes grupos, uno mayoritario que engloba a 10 colonias que presentan una similitud superior al 89%, otro que sólo presentaba una colonia, y un último grupo con las tres últimas colonias, presentando una homología de al menos el 71%, curiosamente ninguna de las colonias presentaba homologías del 100% siendo el máximo el 98%.

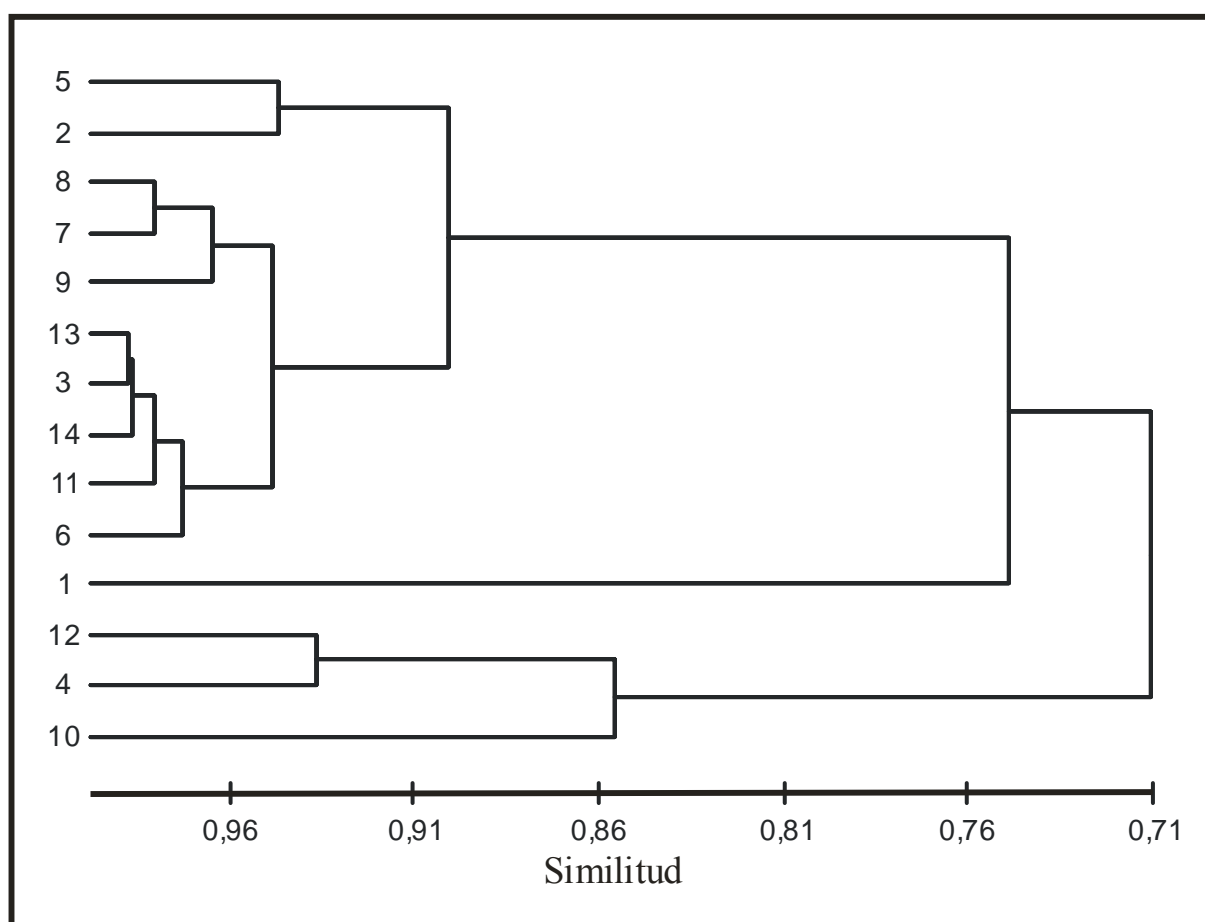


Figura III.8. Similitud del espectro de masas entre la zona de 900 y 1000 de relacion m/z. Se muestran el grado de similitud según el coeficiente de correlación de Pearson con una aglomeración de árbol de tipo enlace medio de catorce colonias de una cepa monoclonal de *M. aeruginosa*



El árbol de quimio-tipos obtenido del análisis de las colonias de campo (Figura III.9), muestra por un lado que no existen diferencias significativas ni entre los dos días muestreados, ni en los dos puntos del embalse analizados. Esto queda patente porque en los grupos encontrados se mezclan colonias tanto de los dos puntos muestreados, como de los dos días en los que se tomaron muestras. Analizando más en profundidad este árbol podemos observar cuatro grandes grupos que presentan una homología de Pearson inferior al 50%, esta separación es debida fundamentalmente al diferente patrón de presencia de microcistinas, puesto que al ser los picos mayoritarios que solían presentar las colonias, los cambios en este patrón hace que los grupos que aparecen se diferencian fundamentalmente debido a este patrón de microcistinas. Así el grupo mayoritario (línea negra en la Figura III.9), incluye 51 de las 60 colonias analizadas (90%), presenta como microcistinas mayoritarias la Mc-YR y Mc-LR. El siguiente grupo más cercano (línea azul), formado por una sola colonia, también se caracteriza por presentar este mismo patrón de microcistinas mayoritarias, pero presenta diferencias importantes en otros picos. Los otros dos grupos presentan el mismo número de colonias tres cada uno (5% del total). El primero (línea verde) se caracteriza por presentar como tipos de microcistinas mayoritarias la Mc-RR y la Mc-LR. El otro (línea roja) que presenta el menor valor de homología, inferior al 10% con el resto de los grupos, se caracteriza por no presentar ninguna microcistina conocida.

La mayor divergencia dentro de estos cuatro grupos se encuentra, como era de esperar, dentro del grupo mayoritario, puesto que al presentar mayor número de colonias estadísticamente puede presentar una mayor divergencia dentro del mismo. Dentro de este grupo podemos definir cuatro subgrupos que se caracterizan por presentar una homología inferior al 70%, dos de ellos engloban un bajo número de colonias, el grupo A y B (una y dos colonias respectivamente) y los otros, el C y el D, son los que engloban la mayor parte de las colonias pertenecientes a esta rama (39 y 11 colonias respectivamente). Ninguno de los grupos, independientemente del tipo de toxina producida o de su posición en el árbol, se pudo diferenciar por análisis microscópico, perteneciendo todas ellas a la especie *M. aeruginosa*. Tampoco puede observarse ninguna relación clara entre la intensidad o el número de picos y la posición en el árbol quimio-taxonómico.

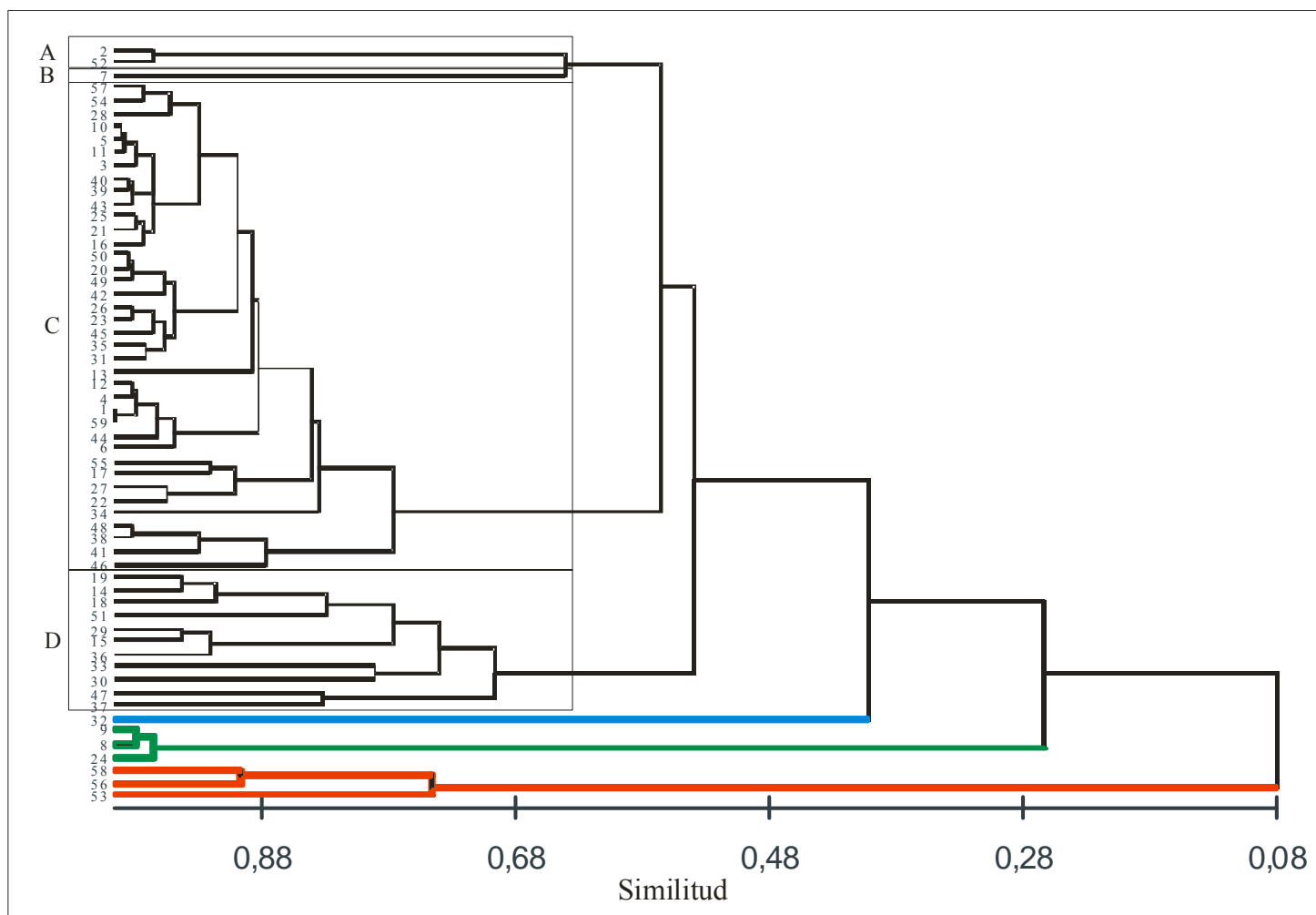


Figura III.9. Similitud del espectro de masas entre la zona de 900 y 1000 de relación m/z . Se muestran el grado de similitud según el coeficiente de correlación de Pearson con una aglomeración de árbol de tipo enlace medio de 60 colonias de campo. Marcado con las letras A, B, C y D los diferentes grupos dentro del grupo mayoritario. Con colores rojo, verde, azul y negro los grupos con menos del 50% de homología.



5. Discusión.

Durante muchos años se ha estado analizando la razón de la existencia de más de 65 tipos de microcistinas diferentes. Desde un principio se investigó a cerca de la causa de esta diversidad química que este tipo de compuestos presentaban y en estos últimos años se ha identificado los genes responsables de la síntesis de este tipo de compuestos ((Rouhiainen y col., 2004); (Christiansen y col., 2003) y (Tillett y col., 2000)). Cuando se ha intentado explicar esta diversidad en función de la secuencia genética de los módulos de adenilación, no se ha encontrado una correlación una correspondencia directa entre el aminoácido incorporado y el que resulta de la predicción que se realiza en función de la secuencia aminoacídica que presenta el dominio de adenilación (Kurmayer y col., 2002), de manera que la diversidad sería explicada por la plasticidad catalítica de las enzimas que son responsables de la síntesis de microcistinas ((Dittmann y col., 1997); (Nishizawa y col., 2000) y (Tillett y col., 2000)). Aunque Mikalsen y col., 2003 mostraron posteriormente que existía cierta correlación entre la estructura primaria del módulo de adenilación y el tipo de microcistina producida, mostrando que las cepas de *Microcystis* que poseen en el primer modulo de adenilación al que llamaron *mcy*, similar al *mcy C*, producía el tipo de microcistina RR y sus variantes.

Durante el periodo en el cual fue posible detectar microcistinas sólo se detectaron tres especies de cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas, aunque sólo una de ellas coincidió temporalmente con el periodo en el que las toxinas pudieron detectarse. Esta coincidencia temporal refuerza la idea de que esta cianobacteria *M. aeruginosa* fue la principal fuente de microcistinas. Aunque no es posible identificar microscópicamente las cepas de *Microcystis* que son capaces de producir microcistinas, sí se han establecido porcentajes, bastante similares en varios lugares del mundo, de cepas de cada especie que presentan toxicidad, por ejemplo entre el 72% y más del 98% de colonias de *M. aeruginosa* presentan microcistina, o poseen alguno de los genes necesarios para su síntesis ((Fastner y col., 2001); (Via-Ordorika y col., 2004) y (Wilson y col., 2005)). Por otro lado, las otras dos especies presentes durante este periodo *Aph. flos-aquae*, y *M. flos-aquae* parecen tener una menor relevancia en la producción de microcistinas. *Aph. flos-aquae*, aunque llegó a ser muy abundante durante la primera parte del periodo en el que las microcistinas fueron detectadas, presenta muy baja probabilidad de producir microcistinas, sólo se ha encontrado una



referencia en el que esta especie sea definida como productora de hepatotoxinas (Oliver 1994), y en esa ocasión no se pudo confirmar sin lugar a dudas que esta fuera la especie productora. Por otro lado se hicieron análisis de Maldi-Tof de algunas de las colonias del embalse de Santillana y de otros embalses y en ninguno de los casos fue posible detectar microcistinas (datos no mostrados). Por último se han detectado en múltiples ocasiones cepas de *M. flos-aquae* productoras de microcistinas, aunque estadísticamente la probabilidad de presentar microcistinas es menor puesto que el porcentaje es inferior al 50% (Via-Ordorika y col., 2004). Además únicamente aparece en los dos últimos muestreos del año y en una proporción menor del 10%, coincidiendo con *M. aeruginosa* que fue dominante en esos momentos. Todos estos datos parecen favorecer la hipótesis de que la especie fundamentalmente la responsable de la producción de microcistinas en el embalse de Santillana fue *M. aeruginosa*.

En principio el cambio en la especie química que se produjo en el embalse de Santillana podía tener dos posibles causas, podía deberse a un cambio de cepa dentro de la especie mayoritaria que acarrearía un cambio en los tipos de microcistinas producidas, o que ese cambio se debiera a la plasticidad catalítica de las enzimas que sintetizan las microcistinas y por lo tanto, el cambio del patrón de microcistinas no se correlacionaría con un cambio en los genes que sintetizan las microcistinas, en especial el gen *mcy B*, cuyo segundo módulo de incorporación es el encargado de catalizar la introducción del primer aminoácido variable (Tillett y col., 2000) que es el que varió entre las dos microcistinas. Como ya hemos comentado con anterioridad, no existe unanimidad acerca de si la secuencia primaria de aminoácidos se correlaciona con los tipos de microcistinas que produce una cepa. En el embalse de Santillana podemos ver que existe una correspondencia entre el tipo de alelo del gen *mcy B* que presenta la cepa mayoritaria en el embalse y la microcistina producida. Siendo este patrón similar al encontrado en los dos controles, los cuales provienen de una cepa aislada del mismo embalse, y que produce mayoritariamente las microcistinas LR y RR (consiste en la banda sin digerir), y de la cepa que produce mayoritariamente las microcistinas LR e YR (cepa que resulta digerida en al menos dos bandas). Estos dos genotipos coinciden con los tipos V y I descritos por (Kurmayer y col., 2002). El tipo I coincide exactamente en los dos casos produciendo como microcistinas los tipos YR y LR y no siendo posible detectar la variante RR. En el caso de la variante V descrita por (Kurmayer y col., 2002) encontraron 5



colonias que se correspondían a esta variante, cuatro de las colonias aisladas producían microcistina LR y RR, y de estas cuatro colonias dos de ellas también presentaban microcistina YR, la última colonia perteneciente a esta variante sólo presentaba variantes de microcistina RR y LR desmetilada. Bajo estas premisas nos encontramos que en el caso de la variedad V del gen *mcy B* presentaban una mayor inespecificidad en cuanto al aminoácido activado que la que presentaba la variedad tipo I. Algo muy parecido se observa en las colonias encontradas en el embalse de Santillana, si consideramos que las colonias que presentaban como mayoritarias las microcistinas LR, e YR, no presentaba microcistina RR, y por tanto deberían presentar el alelo tipo I del gen *mcy B*. Mientras que las colonias que presentaban como microcistinas mayoritarias RR y LR se caracterizaron por presentar un mayor número de microcistinas minoritarias, entre ellas la microcistina YR (datos no mostrados), deberían pues poseer el alelo tipo V del gen *mcy B*. Así pues en el caso del embalse de Santillana podemos observar que existe una clara correspondencia entre los tipos de microcistinas mayoritarios y el alelo que se presentaba en cada uno de los casos durante todo el periodo de muestreo, como ha defendido (Mikalsen y col., 2003). La idea que proponemos es que la secuencia de los genes *mcy* indican cual es el sustrato preferente que las enzimas presentan, así dependiendo de ella se producirán unos tipos mayoritarios u otros, además indicarían cual es la especificidad que presentan las enzimas a los distintos aminoácidos, y posiblemente las condiciones medioambientales pueden actuar sobre esa flexibilidad en reconocer el sustrato modificando los tipos de microcistinas producidos. En condiciones de cambios ambientales extremos podría cambiar por completo el patrón de microcistinas que una cepa puede producir. No podemos olvidar que la existencia de recombinación dentro de los genes *mcy* (Tanabe y col., 2004) aumenta la diversidad que este gen puede presentar y por tanto el poder de generar nuevas variantes de los genes *mcy*, y esto cambiar el patrón de microcistinas producidas por un cultivo o en una muestra de campo.

La quimiotaxonomía se ha utilizado para la distinción de cepas cianobacterianas (Kansiz y col., 1999) y se ha propuesto su utilización en cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas (Fastner y col., 2001). Recientemente se ha realizado un análisis de quimiotipos dentro del género *Microcystis* (Welker y col., 2004) en el que se utilizaron los péptidos encontrados y el análisis de componentes principales, para separar las colonias analizadas, y concluyó que las diferentes morfoespecies de *Microcystis* no se agrupaban



utilizando esta metodología. Además concluyó que *M. aeruginosa* era no solo el principal productor de microcistinas, si no que además estos eran una de las causas fundamentales en la separación de los diferentes grupos encontrados dentro de esta morfoespecie. Por todo ello nosotros hemos asumido una serie de condiciones previas antes de realizar el estudio quimiotaxónomico. Así decidimos limitar el rango utilizado para el análisis quimiotaxonómico a la región comprendida entre 900, y 1100 m/z donde se encuentran fundamentalmente dos grandes grupos de péptidos: Las cianopeptolinas, y las microcistinas (Welker y Von Dohren 2006), aunque consideramos que al analizar solo una morfoespecie cianobacteriana, *M. aeruginosa*, nos daba suficiente capacidad para discriminar entre los diferentes quimiotipos.

Por otro lado, las diferencias en el número de picos, y su correlación con la intensidad total que éstas presentaban recomendaban realizar una normalización a la intensidad total obtenida en la zona de trabajo, y no recomendaban la utilización de la presencia o ausencia de los picos para realizar el análisis de similitud con las colonias seleccionadas. Esta intensidad no depende del tamaño de la colonia, ésta por lo tanto dependerá probablemente de la extracción que realiza la matriz, que al tratarse de una extracción *in-situ*, sin realizar ninguna ruptura celular ni homogenización de la muestra, puede no ser suficiente para realizar una extracción perfecta de los péptidos. Esto hace recomendar que en posteriores trabajos, se realicen los análisis, no en función del numero de disparos del láser, como se realizó en los trabajos iniciales, (Fastner y col., 2001), (Welker y col., 2003), si no en función de la intensidad del pico máximo como recomienda (Welker y col., 2006), o probablemente sería más interesante realizar todos los análisis de Maldi-Tof igualando la intensidad total recogida. Puesto que según los datos obtenidos permitiría definir un valor limite de 70000 unidades de intensidad como el adecuado.

Dado la poca bibliografía existente sobre quimiotaxonomía de cianobacterias, no existe ningún valor de similitud del espectro de masas a partir del cual consideramos que estamos ante dos cepas diferentes, valor que existe cuando trabajamos con secuencias genéticas (Rossello-Mora y Amann 2001). Puesto que el metabolismo es modulable, cosa que no ocurre con las secuencias genéticas, deberíamos encontrar en principio una mayor diversidad en la similitud que presenta el mismo quimiotipo que el que presentan las



secuencias genéticas. Para obtener una idea de cual sería el valor de diversidad a partir del cual podemos considerar que nos encontramos con una cepa diferente, se seleccionaron colonias de diferente tamaño similar a las que podemos encontrar en el campo para realizar ese mismo análisis quimiotaxonómico, primero cabe destacar que ninguno de los clones analizados presentaba una similitud del 100% en los espectros de masas lo que sería prueba de que la diversidad metabólica es mucho mayor que la genética. El valor mínimo de similitud entre todas ellas fue 71. A pesar de que no existen todavía datos suficientes para establecer con certeza cual podría ser el valor a partir del cual podemos diferenciar las cepas de cianobacterias, hemos considerado que el valor limite que define un mismo quimiotipo podría ser del 70% de similitud. Con este valor de similitud como límite de corte entre cepas diferentes, podemos definir siete cepas de la misma especie formando parte del afloramiento durante el primera fase del mismo (hasta el 12 de septiembre), pero dos de ellas representaban más del 83% de las colonias, y las otras seis cepas restantes el 17% restante, representando una de ellas como máximo el 5% de las colonias encontradas. Esto indica en este embalse que al menos durante el afloramiento que tuvo lugar entre los días 5 y 12 de septiembre hubo una diversidad elevada (pudieron encontrarse 7 cepas quimiotaxonómicamente diferenciadas), pero sólo dos de ellas presentaron mas del 80% de la población. Los trabajos publicados sobre la diversidad genética de cianobacterias del género *Microcystis* se han realizado sobre todo con muestras de múltiples embalses, o en sistemas geográficamente grandes como el mar Báltico ((Wilson y col., 2005); (Laamanen y col., 2002); (Laamanen y col., 2001); (Yoshida y col., 2005) ; (Welker y col., 2004) y (Kim y col., 2006)). Nuestros datos indican por un lado que existe una alta diversidad dentro de la especie *M. aeruginosa*, lo que esta de acuerdo con los datos obtenidos por (Wilson y col., 2005) que encontró una elevada diversidad siendo ésta incluso mas importante dentro de un embalse que entre embalses. Aunque esta no es la única situación posible, puesto que otros autores han encontrado que la diversidad en un afloramiento de cianobacterias puede ser pequeña como ocurre dentro de la especie *Aph. flos-aquae* que puede encontrarse en mar báltico (Laamanen y col., 2002). Esta diferencia entre estos dos ambientes puede deberse a que las condiciones ambientales que el mar Báltico presenta extrema para esta *Aphanizomenon*, de manera que solo pocas de las cepas de esta especie son capaces de sobrevivir en este ambiente.



No existen datos de diversidad de *M. aeruginosa* en afloramientos donde sólo se encuentra esta especie de *Microcystis*. En este momento y según los datos existentes en la bibliografía, parece que aún conservando una elevada diversidad (nos encontramos 7 variantes diferentes) la mayor parte de la biomasa parece dominada por sólo dos de ellos, en el artículo de (Wilson y col., 2005) basado en el aislamiento de diferentes cepas de *M. aeruginosa* en diferentes embalses, donde se analizaron 67 cepas aisladas, el 79 % de ellas fueron diferentes. En el embalse de Santillana por otro lado mostró una menor variabilidad, en dos momentos puntuales se analizaron 60 colonias, estas pueden dividirse en 7 grupos diferentes y el 83% de ellas pertenecen a dos únicos quimiotipos. La posible explicación de esta baja diversidad encontrada puede explicarse por un lado si consideramos que cuando se analiza un afloramiento, debería esperarse encontrar como mayoritarias las cepas que mejor se adapten a las condiciones ambientales que se encuentran en ese momento determinado en que aparece el afloramiento, encontrándose el resto de cepas que son capaces de crecer mejor en otras condiciones como minoritarias. Esto explicaría, como ya hemos comentado con anterioridad, el cambio de tipos de microcistinas mayoritarios. Las correlaciones de los tipos de microcistinas producidas parecen indicar que la cepa que producen microcistinas YR/LR se encuentran favorecidas si la relación nitrógeno inorgánico disuelto – fósforo total más elevado, mientras que la cepa que son capaces de producir RR/LR se encuentran principalmente favorecidas por altas concentraciones de nitrógeno inorgánico total, en especial por las concentraciones de nitrato, aunque no se han realizado aislamientos de estos organismo que puedan confirmarlo. Cabe destacar que el tipo de microcistina RR, requiere mayor cantidad de nitrógeno que el tipo YR, lo que podría ayudar a explicar este cambio de cepa mayoritaria. También podemos observar que el análisis del gen *mcy B* nos permite detectar una menor diversidad (dos variantes principales) que la determinada por Maldi-tof, al igual que ocurría en estudios genéticos (Wilson y col., 2005), esto se apoya con los datos encontrados por Maldi-tof, e indica que los genes son relativamente poco variables dentro de la población de *mcy* dentro de *M. aeruginosa*.

Otras correlaciones interesantes son por ejemplo las correlaciones negativas de los parámetros atmosféricos con la presencia de Mc-RR, que podrían mostrar como ante un empeoramiento de las condiciones (temperatura, viento e insolación) la población de cianobacterias va disminuyendo y la Mc-RR (que aparece cuando las condiciones empiezan



empeorar, principios del otoño) es la que mejor muestra el efecto de estos factores. Por otro lado, la Mc-LR se correlaciona con la presencia de fósforo total, lo que indicaría que a mayor biomasa (mayor cantidad de fósforo total) la concentración de la toxina mayoritaria es mayor. Respecto a la precipitación ya ha quedado demostrado que la precipitación puede favorecer el crecimiento de *Microcystis* si aportan nutrientes (Oh y col., 2001). En cuanto a los organismos presentes y la correlación con la microcistina, parece claro que, como cabría esperar, que el productor fundamental es *M. aeruginosa* el cual parece que es la única cepa productora de microcistinas en este embalse durante este afloramiento.

Estos cambios en la cepa mayoritaria ocurrieron en periodos cortos de tiempo. Desde el día 19 de septiembre, en el cual nos encontramos los dos tipos de genes *mcy B*, hasta el día 3 de octubre se produjo un crecimiento masivo de *Microcystis* y un cambio de cepa dominante. Teniendo en cuenta que un 25% de la clorofila del día 19 fue debida a las cepas que encontramos el día 19 (tenemos aproximadamente el 50% de la biomasa de cianobacterias dominada por *Microcystis*, y de esta parte el 50% a las cepas productoras de los tipos LR/RR), y que en el día 3 de octubre el 90% de la biomasa se debe a *Microcystis* y que sólo parecen encontrarse la cepa/cepas productoras de los tipos LR/RR, nos encontramos que la concentración de clorofila de esta cepa/cepas productoras en el embalse varió de 4,25 $\mu\text{g Chl a L}^{-1}$ a 91,2 $\mu\text{g Chl a L}^{-1}$ lo que supone un incremento de 21 veces en la concentración en tan solo 14 días, esto implicaría que esta cepa presentaría un tiempo de generación de menos de dos días, inferior a los publicados por (Reynolds y col., 1981) que fueron de entre cinco días y una semana. Esto indicaría que durante la fase exponencial del desarrollo de un afloramiento nos encontraríamos con tasa de crecimiento similares a las que presentan las algas verdes y las diatomeas, y que por lo tanto estas cianobacterias no pueden considerarse organismos de crecimiento lento. Naturalmente existen otras posibilidades, entre ellas la mas plausible podría ser el reclutamiento de un tipo de cepa que posteriormente desplazó al otro tipo de cepas que se encontraba en franco deterioro “decay”, pero los valores similares en cuanto a tipo de organismos encontrados en las dos orillas que habla de la homogeneidad que ocurría en le embalse que apoyaría la idea de cambio en el tipo de cepas encontradas, mas que el reclutamiento de una cepa diferente.



CAPÍTULO IV



Anatoxinas en Embalses Españoles

1. Introducción

Entre los compuestos que pueden ser producidos por el metabolismo secundario de las cianobacterias, se encuentra una familia heterogénea de compuestos que han sido agrupados por el efecto que presentan sobre los mamíferos, su capacidad neurotóxica. Químicamente hablando, estos compuestos neurotóxicos se pueden dividir en tres familias diferentes:

- ↗ Las saxitoxinas. Las neurotoxinas más estudiadas, que son producidas tanto por las cianobacterias como por los dinoflagelados (causantes de las mareas rojas).
- ↗ La anatoxina-a y variantes. Producidas únicamente por cianobacterias. Se han descrito dos tipos principales la anatoxina-a y su principal variante química la homoanatoxina-a,
- ↗ Anatoxina-a(s) un organofosforado natural químicamente diferente a la anatoxina-a.

En ambientes acuáticos de agua dulce las neurotoxinas de cianobacterias más estudiadas son las anatoxinas. La anatoxina-a es la primera toxina producida por cianobacterias que fue definida química y funcionalmente (Carmichael 1997). A pesar de esto llama la atención la baja cantidad de trabajos publicados sobre dicha toxina cuando los comparamos con los publicados acerca de otro grupo de toxinas de cianobacterias, las microcistinas. El desconocimiento que existe en la actualidad sobre la prevalencia e importancia de esta toxina, hace que en la actualidad no se haya establecido un valor guía en ningún país de la Unión Europea, ni existe obligación de analizar su presencia ni en aguas de bebida ni de baño, ni siquiera cuando las cianobacterias dominan la población fitoplanctónica.



1.1. Estructura química de la anatoxina-a y biosíntesis.

La anatoxina-a es un alcaloide de pequeño tamaño (p.m. = 165), químicamente es una amina secundaria bicíclica ((2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]-non-2,3-ene) (Figura VI.1). Aparte de esta toxina dentro del grupo de las anatoxinas, suelen incluirse otros dos compuestos. Uno de ellos es una variante química de la anatoxina-a, la homoanatoxina-a, un compuesto muy similar que sólo se diferencia por la existencia de un grupo propionil en lugar de un grupo acetil en el carbono-2 (Figura IV.1). El otro compuesto es la anatoxina-a(s) que al ser tan diferente químicamente hablando nos ha parecido correcto separarlo en un grupo de toxina diferente, y no nos vamos a referir a él en este capítulo.

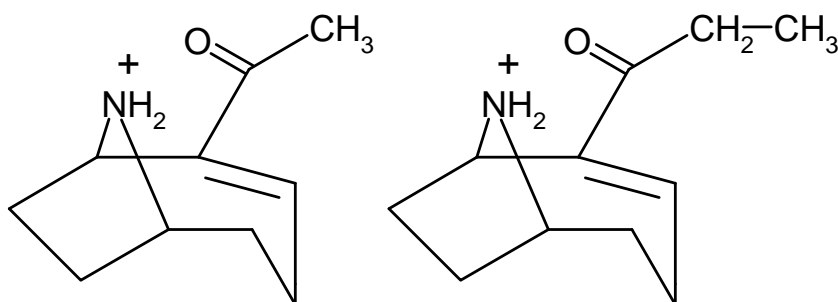


Figura IV.1: Estructura química de la anatoxina-a y la variante homoanatoxina-a. Extraído de Sivonen y Jones 1999

Estructuralmente la anatoxina-a está relacionada con los alcaloides de la clase de los tropanos, entre los que se encuentra la cocaína (Hemscheidt y col., 1995) si bien el anillo es ligeramente diferente al encontrado en plantas vasculares (con siete carbonos en lugar de ocho) (Moore 1999). Son sólo dos los trabajos publicados acerca de la posible vía biosintética de la anatoxina-a. En ellos se establecen dos posibles vías de síntesis. El primero de los estudios se realizó utilizando ^{14}C (Gallon y col., 1994) y defiende que el anillo de pirrolidina que poseen tanto la anatoxina-a como la homoanatoxina-a siguen la misma ruta que la descrita en plantas superiores para la producción de la familia de alcaloides tropanos. El segundo, publicado con



posterioridad, utilizando metodologías más finas (^{13}C y resonancia magnética nuclear) (Hemscheidt y col., 1995) defiende que los datos obtenidos son incompatibles con la vía de síntesis propuesta por (Gallon y col., 1994), al indicar los datos experimentales que el C-1 del aminoácido iniciador de la síntesis (ellos postulan que se trata del glutámico-semialdehído) se mantiene en la molécula final (Figura IV.2). Este mantenimiento del primer carbono sería incompatible con la otra vía de síntesis propuesta por (Gallon y col., 1994).

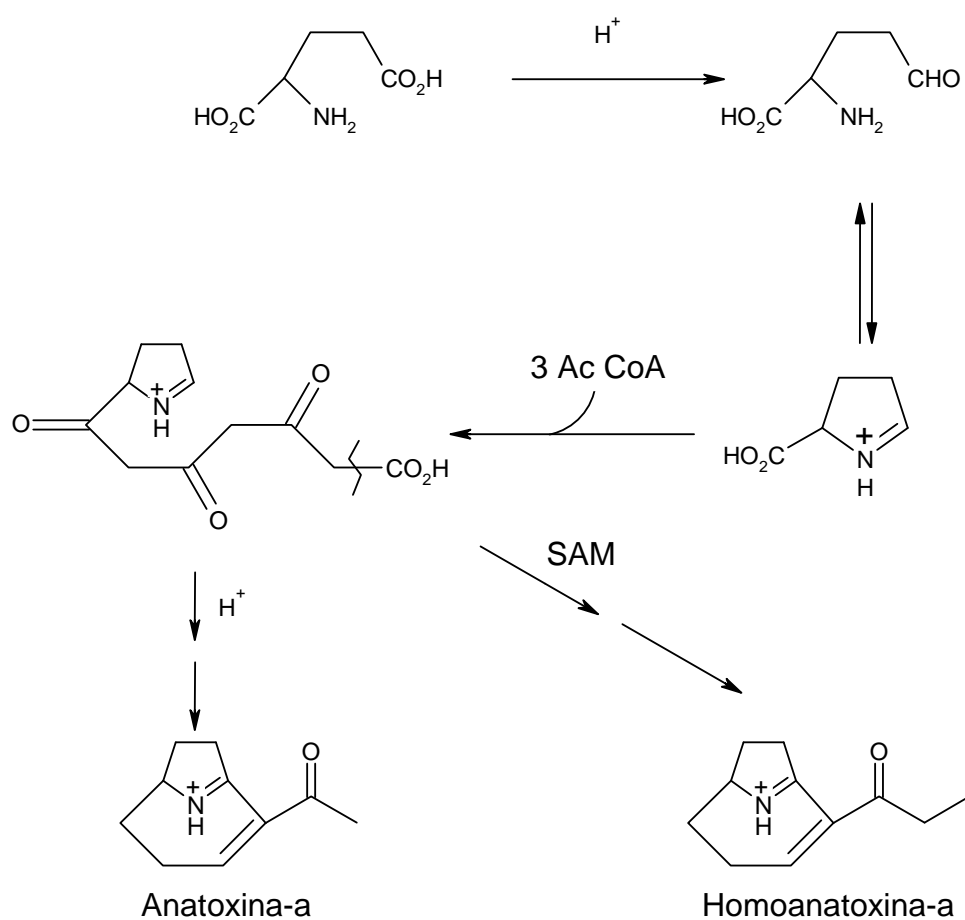


Figura IV.2: Posible ruta biosintética de la anatoxina-a y la variante homoanatoxina-a. SAM = S-adenosilmetionina, Ac CoA = Acetil-Coenzima A. Extraído de Hemscheidt y col., 1995.



En cuanto a cuales podrían ser las actividades enzimáticas implicadas en la síntesis de anatoxina-a no existen datos concluyentes, sólo un artículo (Gallon y col., 1994) se ha publicado acerca de posibles de actividades enzimáticas implicadas en su síntesis. En este artículo se indica que los genes responsables de la síntesis de anatoxina-a no se localizarían en el cromosoma, si no en un plásmido (la modificación de un plásmido que pasa de 10 a 6,5 Kb da lugar a la pérdida de la capacidad de producción de anatoxina-a), si bien falta cualquier confirmación posterior acerca de esta localización plasmídica, Aparte de esta posibilidad también se indica que las siguientes actividades enzimáticas podrían estar relacionadas con la síntesis (Gallon y col., 1994) :

- Arginina descarboxilasa.
- Ornitina descarboxilasa.
- Diamina oxidasa.

Las dos primeras actividades serían responsables de la síntesis de putrescina y la siguiente de ciclar la putrescina y transformarla en $\Delta 1$ - pirrolina, que sería posteriormente transformada en anatoxina-a. Esta ruta de síntesis fue posteriormente invalidada por (Hemscheidt y col., 1995), lo que pone en duda los datos obtenidos en este trabajo, y por lo tanto dificulta el concluir nada acerca de las enzimas responsables de la síntesis de anatoxina-a.

1.2. Organismos productores.

Las cianobacterias son los únicos organismos productores de anatoxina-a y homoanatoxina-a, si bien dentro de ese *filum* sólo se han detectado especies capaces de producirlas en unos pocos géneros. Estos géneros para los cuales se han detectado especies productoras son: *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum*, *Planktothrix* y *Raphidiopsis* (Codd y col., 2005b) (Figura IV.3). Este tipo de toxinas han sido detectadas tanto en muestras naturales dominadas por alguno de estos géneros definidos como productores, como mediante el aislamiento de cepas de cianobacterias productoras para todos ellos.

Cuando analizamos el numero de especies aisladas que son capaces de producir anatoxina-a u homoanatoxina-a, observamos que sólo se han publicado la existencia de



diez cepas de las cuales ocho de ellas están caracterizadas a nivel de especie y las restantes a nivel de género, siendo estas últimas *Oscillatoria* sp. cepa 193 (PCC 9240), (Araoz y col., 2005), y *Cylindrospermum* sp. (Sivonen y col., 1989). Entre las caracterizadas a nivel de especie nos encontramos, *Oscillatoria formosa* NIVA CYA-92 (PCC 10111) (Araoz y col., 2005), *Planktothrix rubescens* (Viaggiu y col., 2004b; Viaggiu y col., 2004b), *Anabaena flos-aquae* (Carmichael y col., 1979), *Phormidium favosum* (Mikalsen y col., 2003), *Raphidiopsis mediterranea* (Namikoshi y col., 2003), *Anabaena planktonica* (Bruno y col., 1994b), *Aphanizomenon flos-aque* (Rapala y col., 1993) y *Aphanizomenon issastchenoi* (Wood y col. 2007). El número de cepas aisladas es muy bajo, especialmente cuando lo comparamos con las cepas aisladas productoras de microcistinas. Esta falta de datos hace difícil establecer de manera fiable cuáles son las especies potencialmente productoras de anatoxinas dentro de estos géneros.

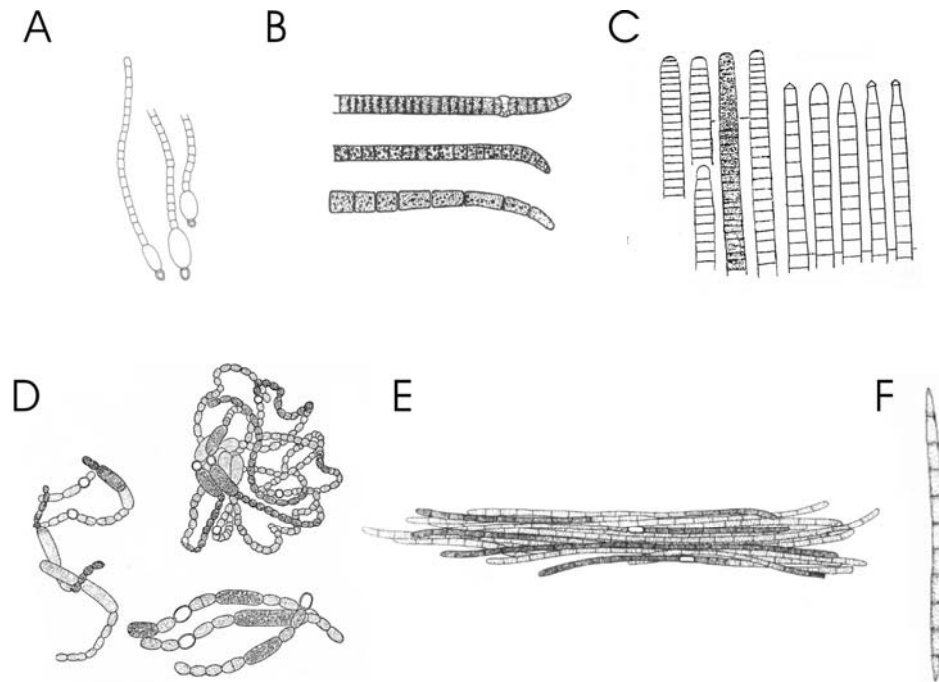


Figura IV.3: Géneros cianobacterianos productores de anatoxina. A=*Cylindrospermum*, B=*Oscillatoria*, C=*Planktothrix*, D=*Anabaena*, E=*Aphanizomenon* y F=*Raphidiopsis*. Extraído de Geitler 1932.

Otra dificultad añadida al establecimiento de las posibles especies productoras viene dada por la similitud que presentan, en especial los géneros *Anabaena* y *Aphanizomenon*. Las diferencias entre estos dos géneros, y sobre todo entre las especies que los forman no están nada claras. Estudios filogénicos han mostrado que las especies



pertenecientes a ambos géneros están mezclados cuando se realiza un árbol filogenético (Rajaniemi y col., 2005). En este trabajo se demuestra que las especies de *Aphanizomenon* y las de *Anabaena* planctónicas forman un único género, y que en todas las posibles especies definidas en función de la similitud del 16S (Stackebrandt y Goebel 1994), nos encontramos morfotipos pertenecientes a *Aphanizomenon* y a *Anabaena* simultáneamente. Esto refuerza la idea sobre la dificultad de definir cuáles son las especies potencialmente productoras de anatoxina, al dificultar en muchas ocasiones la variabilidad morfológica que estos organismos presentan la correcta identificación microscópica del organismo responsable a nivel de especie.

1.3. Toxicidad de las anatoxinas.

El mecanismo de acción se basa en que son agonistas colinérgicos, es decir, son capaces de unirse a los receptores nicotínicos de acetilcolina lo que activa el impulso nervioso. Además este tipo de compuestos presenta una elevada afinidad (mayor que la acetilcolina) por estos receptores, esto evita que la toxina sea liberada y desplazada del tejido. Esto último, junto con la resistencia que presentan a la acción de las acetilcolinesterasas, aumenta el efecto que presentan. El resultado de esta activación del impulso nervioso por un lado y la incapacidad posteriormente de “desactivarse”, produce una despolarización local que abre los canales de Ca^{2+} y Na^{+} dependientes de voltaje. Como resultado de esta estimulación persistente se produce una inhibición de cualquier impulso nervioso posterior, produciendo una parálisis muscular. Esta parálisis muscular es la responsable en mamíferos de la muerte por fallo respiratorio. Además, esta inhibición es muy rápida (tras la inyección intraperitoneal de una dosis letal la muerte ocurre antes de transcurrir 30 minutos), por tanto antes de identificar la naturaleza química del compuesto, y debido a esta rapidez con la que ocurría la muerte fue conocido como VFDF, “Very Fast Death Factor”, factor de muerte muy rápido (Fawell y col., 1999). De hecho en ensayos con muestras que presentaban elevadas concentraciones de anatoxina-a la muerte de los ratones inyectados intraperitonealmente (i.p) ocurrió en un intervalo de tiempo de entre 2 y 19 minutos (Sivonen y col., 1989).



Cuando analizamos las dosis letales 50, observamos que los dos compuestos, la anatoxina-a y la homoanatoxina, presentan valores muy similares con DL_{50} de 200 y 250 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ respectivamente, para inyecciones i.p. (Briand y col., 2003). Esta toxicidad se ve aumentada cuando la inyección se realiza de manera intravenosa, de esta manera la anatoxina-a presenta valores de DL_{50} menores de 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (Fawell y col., 1999). Finalmente, es importante destacar que los valores de DL_{50} para una ruta de exposición por vía oral son entre uno y dos ordenes de magnitud superiores a los intraperitoneales (entre 2000, y 20000 $\mu\text{g Kg}^{-1}$), encontrándonos con un periodo de latencia después de la administración seguida por los síntomas de intoxicación. La muerte del organismo expuesto a este tipo de toxinas, puede evitarse con ventilación mecánica, pero cuando ésta se elimina, incluso después de elevados periodos de tiempo tras la exposición de la toxina el organismo muere. Esta persistencia del compuesto indicaría que la inhibición que se observa es irreversible (Fawell y col., 1999). Respecto a los efectos sobre el desarrollo, no se han observado efectos teratogénicos, es decir no se han observado daños sobre fetos o embriones, a concentraciones inferiores a 2,46 mg kg^{-1} , y tampoco se han observado efectos de carcinogenicos a dosis subletales después de 28 días de exposición (Fawell y col., 1999).

1.4. Anatoxinas en el ecosistema.

Comparado con la que se sabe acerca de las microcistinas y cuál es el efecto que presentan en el ecosistema, se sabe muy poco acerca de este otro grupo de toxinas cianobacterianas. Se conoce cuál es su efecto sobre mamíferos y aves, sobre los cuales actúan como inhibidores del impulso nervioso, pero se conoce muy poco acerca del modo en que actúa sobre otros organismos presentes en el ecosistema, como algas y zooplancton, en el cual las cianobacterias planctónicas suelen encontrarse.

Hay muy pocos trabajos publicados, sobre el efecto de las anatoxinas en organismos fotosintéticos, reduciéndose los artículos publicados en revistas internacionales a dos trabajos principales ((Mitrovic y col., 2004) y (Kearns y Hunter 2001)). En el primero de ellos muestran que la anatoxina-a afecta a la fotosíntesis de *Lemna minor*. Además observan que afecta a otras actividades enzimáticas como son la



actividad peroxidasa y glutathion-S-transfererasa implicadas en la detoxificación, tanto de compuestos exógenos como en la respuesta a stress oxidativo. Este efecto se observó tanto en *Lemna minor* como en el microalga filamentosa *Chladophora fracta*. Un punto a tener en cuenta acerca de este trabajo, son las altas concentraciones de anatoxina necesarias para observar los efectos descritos, en el rango de mg L^{-1} , concentraciones que los propios autores reconocen como muy elevadas y que no han sido descritas en los embalses y lagos en los que se ha detectado la presencia de este compuesto. El otro trabajo es ecológicamente más significativo al implicar a una alga verde, *Chlamydomonas reinhardtii*, que puede entrar en competencia directa con las cianobacterias, e indica que su movilidad se ve limitada por la anatoxina-a. Esta imposibilidad de moverse produce el asentamiento del cultivo, lo que podría resultar en una ventaja evolutiva para las cianobacterias productoras de este tipo de compuestos, al tener menor competencia por la luz y los nutrientes.

El efecto de la anatoxina-a sobre el zooplancton está más estudiado que su efecto sobre plantas y organismos fotosintéticos acuáticos. Esto podría ser debido a la idea que se tiene de este tipo los compuestos tóxicos producidos por las cianobacterias como mecanismo de defensa contra la depredación ((Reinikainen y col., 2002); (Claska y Gilbert 1998); (Gilbert 1996a); (Gilbert 1996b) y (Gilbert 1994)). De cualquier manera los efectos que las anatoxinas presentan sobre los animales no han sido estudiados tan en profundidad como los de las microcistinas (ver Capítulo II).(Kearns y Hunter 2001)

Se ha analizado el efecto que esta toxina presenta sobre los tres grandes grupos de zooplancton. Los primeros organismos estudiados fueron los rotíferos, que mostraron ser sensibles tanto a anatoxina-a soluble como a cianobacterias productoras pero no a filtrado de los cultivos (la anatoxina-a no se excreta, y se define como endotoxina) (Gilbert 1994), si bien las diferentes especies analizadas presentaron diferente sensibilidad como ocurre con el efecto de las microcistinas (ver Capítulo II). También se ha estudiado el efecto de la anatoxina en cladóceros (*Daphnia pulex*) (Claska y Gilbert 1998) y en copépodos (Reinikainen y col., 2002), a quienes afecta tanto a su capacidad de reproducción como a su supervivencia.



Probablemente son los pájaros y los mamíferos, los animales sobre los cuales los efectos de la anatoxina han sido mas evidentes, encontrándose muertes de mamíferos (Edwards y col., 1992) y de aves después de haber ingerido agua contaminada con estos compuestos. Por ejemplo, muerte masivas de flamencos asociadas a este tipo de compuestos se han publicado recientemente (Krienitz y col., 2003).

1.5. Legislación.

El desconocimiento general que existe acerca de la importancia de la anatoxina-a en los ecosistemas de agua dulce, explica la falta de legislación al respecto de su presencia en la mayor parte de los tanto en aguas de baño o de consumo. Hasta el momento sólo un país en el mundo, Nueva Zelanda, posee un valor guía provisional para esta toxina establecido para aguas de bebida de $6 \mu\text{g L}^{-1}$ y de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ para homonatoxina-a (Kouzminov 2005). La legislación neozelandesa también indica cuál debería ser el método de medida recomendado, en este caso HPLC-MS. En España, como en el resto de países, no existe ninguna legislación que obligue a determinar la presencia de esta toxina ni su concentración cuando hay cianobacterias productoras presentes.

Parte de los muestreos realizados en los embalses situados fuera de la comunidad de Madrid, así como el análisis taxonómico de las cianobacterias que en ellos se encontraban han sido realizados por personal del Centro de estudios hidrográficos del CEDEX.



2. Objetivos

Dada la elevada proporción de muestras que presentan cianobacterias potencialmente productoras de anatoxina-a en embalses españoles, los objetivos de este capítulo son:

- ⇒ Analizar la presencia y prevalencia de anatoxinas en embalses españoles, así como analizar las concentraciones a las que se presentan dichos compuestos
- ⇒ Identificar cuáles son los posibles organismos productores de estos compuestos en cada embalse analizado.
- ⇒ Identificar qué embalses dentro de los analizados, muestran una mayor probabilidad de presentar este tipo de compuestos.
- ⇒ Establecer un periodo de máxima probabilidad de aparición de estas toxinas en España.



3. Materiales y Métodos.

3.1. Zona de Estudio.

La zona de estudio incluye los embalses de Lozoya, Río Sequillo, El Vellón, Santillana, Valmayor, San Juan y Picadas descritos ya en el capítulo I. Además se incluyeron otros tres situados en la Comunidad de Madrid en los cuales se realizó un estudio esporádico, los embalses de El Atazar, del Villar y de Puentes Viejas y cinco embalses situados fuera de la región de Madrid: los embalses de Arcos (situado en la cuenca del Guadalquivir), Zujar (cuenca del Guadiana), Cazalegas y Rosarito (Cuenca del Tago) y Cuerda del Pozo (Cuenca del Duero).

3.1.1. Embalse de Arcos.

El embalse de Arcos se encuentra situado en la provincia de Cádiz, en el término municipal de Arcos de la Frontera (Figura IV.4). Recibe aguas del río Guadalete, y su cuenca esta dominada por areniscas calcáreas, encontrándose en la cuenca también una zona importante dominada por rocas metamórficas, concretamente gneiss.

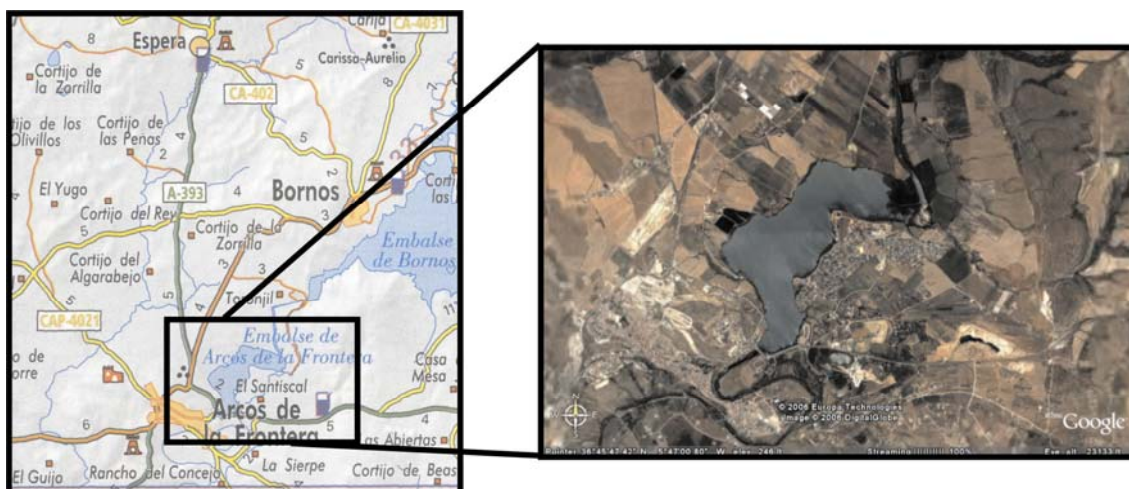


Figura IV.4: Situación del embalse de Arcos.



En la Tabla IV.1 podemos ver algunas de las características principales de la presa. Entre las que podemos destacar su pequeño tamaño, con un volumen embalsado de 14 hm^3 .

3.1.2. *Embalse de Zujar.*

El embalse de Zujar se encuentra situado en la provincia de Badajoz en los términos municipales de Castuela y Esparragosa, y embalsa aguas del río Zujar, afluente del Guadiana (Figura IV.5). Este embalse almacena 302 hm^3 (Tabla IV.1) y presenta una profundidad media de casi 21 m. El embalse se encuentra construido en una zona donde geológicamente dominan los conglomerados, las grawacas y las pizarras.



Figura IV.5: Situación del embalse de Zujar.

3.1.3. *Embalse de Cazalegas.*

El embalse en Cazalegas pertenece a la cuenca hidrográfica del Tago y embalsa aguas de río Alberche, afluente del Tago. Este embalse está situado en la provincia de



Toledo, en los términos municipales de Cazalegas y San Román de los Montes (Figura IV.6). Cabe destacar que junto al embalse de Arcos, es el embalse más pequeño analizado con un volumen máximo embalsado de 11 hm^3 y una profundidad máxima de 15m (Tabla IV.1). Geológicamente la cuenca del río en la zona cercana a este embalse se encuentra dominada por rocas sedimentarias, en particular arenas, areniscas, y conglomerados.

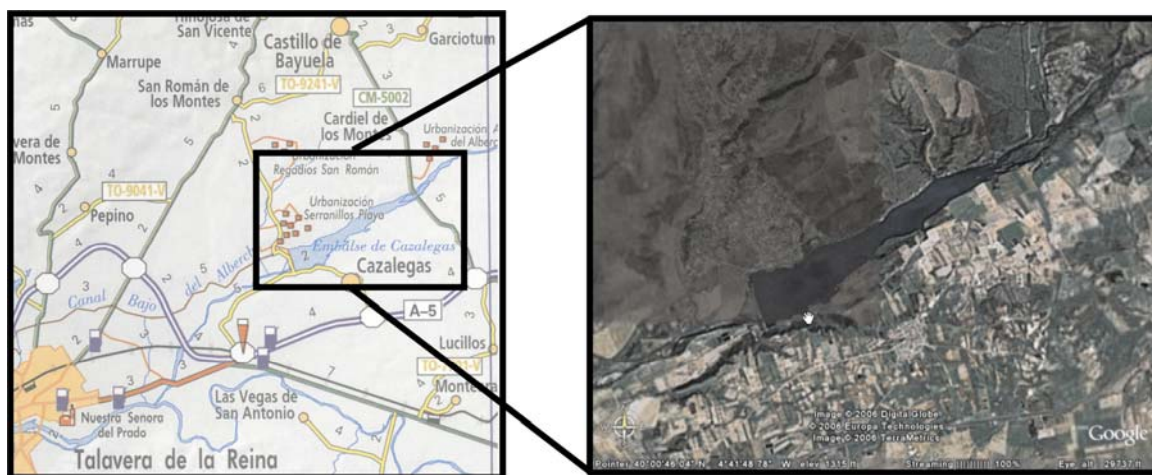


Figura IV.6: Situación del embalse de Cazalegas.

3.1.4. Embalse de Rosarito.

Situado también en la cuenca hidrográfica del Tajo, este embalse de la provincia de Toledo que recibe aguas del río Tietar, esta situado en los términos municipales de Oropesa y Candeleda (Figura IV.7). La cuenca de este embalse se encuentra dominada fundamentalmente por rocas graníticas. El embalse con una profundidad máxima de 33 m pero curiosamente presenta una gran área inundada, de mas de 1400 ha, lo cual puede explicarse por la profundidad media que presenta, una de las más bajas encontradas, de 6,9 m, similar a la encontrada en embalses mucho más pequeños, como son los embalses de Arcos y de Cazalegas (Tabla IV.1). La geología de la cuenca en la que se encuentra situado este embalse esta dominada por arenas, areniscas y conglomerados en la parte más cercana al embalse y granitos en la parte superior. También se encuentran pequeñas zonas dominadas por reñas y gneiss

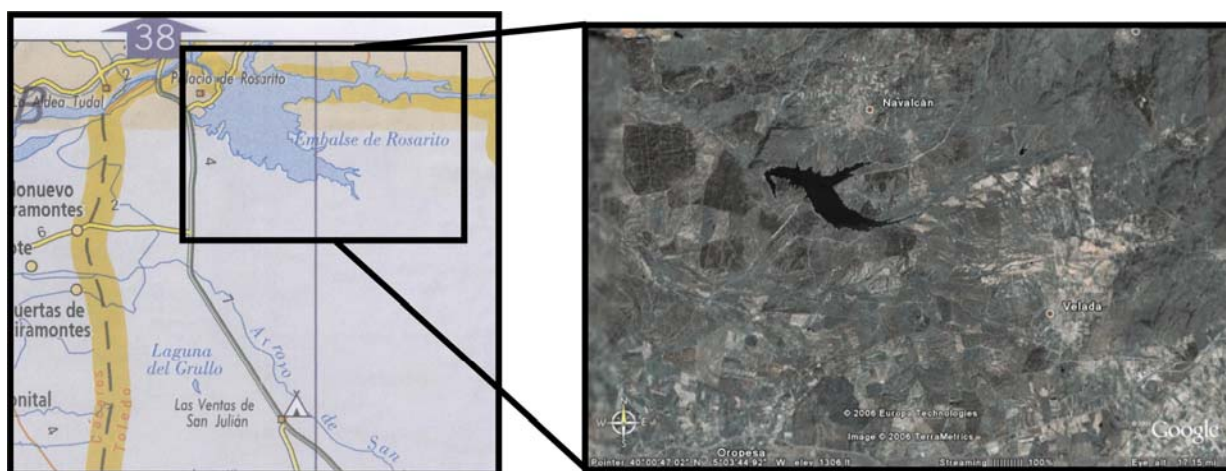


Figura IV.7: Situación del embalse de Rosarito.

3.1.5. Embalse de Puentes Viejas.

El embalse de Puentes Viejas fue el embalse de cabecera del río Lozoya, afluente del río Tago, hasta que se construyó el embalse de Lozoya. Puentes Viejas se encuentra situado en la provincia de Madrid, en los municipios de Gandullas, Buitrago de Lozoya, Puentes Viejas y Paredes de Buitrago (Figura IV.8). Geológicamente la cuenca de río Lozoya ha sido descrita para los embalses de Lozoya y Río Sequillo en el capítulo I, en cuanto a la zona en la cual este embalse se encuentra construido, esta presenta una zona de gneiss, y en el lado derecho de la cuenca una zona dominada por areniscas y calizas. Algunos datos generales del embalse pueden verse en la Tabla IV.1. Como podemos observar, el hecho de que el embalse se encuentre situado en un valle escarpado hace que los datos de área máxima y profundidad máxima se encuentren afectados.

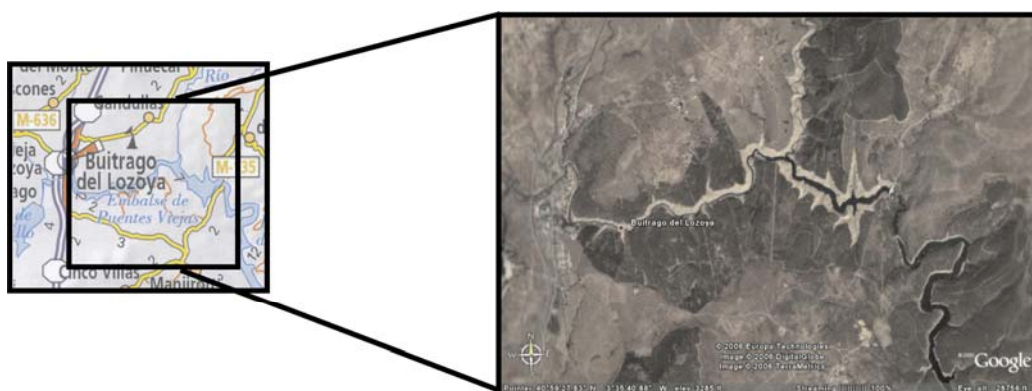


Figura IV.8: Situación del embalse de Puentes Viejas.

3.1.6. Embalse de El Atazar.

El embalse de El Atazar también situado en la cuenca del río Lozoya, se encuentra en los términos municipales de Puentes Viejas, Robledilla de la Jara, Cervera de Buitrago, El Berruenco, El Atazar y Patones Puentes (Figura IV.9). Respecto a la geología sobre la cual está construido, aparecen dos zonas diferenciadas. La parte anterior del embalse se encuentra dominada por granito, mientras que la mitad más cercana al muro se halla dominada por grawacas y cuarcitas. Este embalse es el mayor de la Comunidad de Madrid y el mayor de los embalses analizados, embalsando 425 hm³ y presentando una profundidad media de casi 40 m (Tabla IV.1).

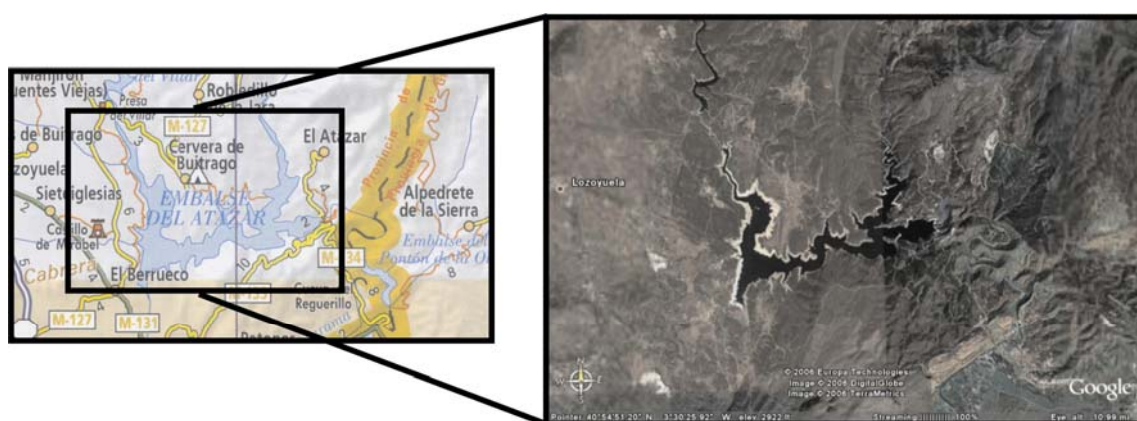


Figura IV.9: Situación del embalse de Atazar.



3.1.7. Embalse de Cuerda del Pozo.

El embalse del Cuerda del Pozo se encuentra situado en la provincia de Soria en el municipio de Vinuesa, embalsa aguas del río Duero, siendo éste el embalse de cabecera (Figura IV.10) Respecto a la geología de la cuenca, nos encontramos con una región dominada por rocas sedimentarias detríticas, siendo importantes en algunas zonas las rocas calizas. Algunos datos generales del embalse pueden verse en la Tabla IV.1.



Figura IV.10: Situación del embalse de Cuerda del Pozo.

Embalse	V. max (hm ³)	Area Max. (ha)	Prof. Max. (m)	Prof. Media (m)	Longitud/ Latitud
Arcos	14	289	12	4.8	36° 45' 52'' N 5° 47' 29'' W
Zujar	302	1449	47	20.8	38° 55' 59'' N 5° 27' 29'' W
Cazalegas	11	159	15	6.9	40° 01' 19'' N 4° 41' 24'' W
Rosarito	85	1475	33	5.8	40° 02' 13'' N 5° 06' 49'' W
Puentes Viejas	49	280	56	17.5	40° 58' 36'' N 3° 39' 31'' W
El Atazar	425	1070	115	39.7	40° 54' 03'' N 3° 31' 18'' W
Cuerda del Pozo	229	2176	45	10.5	41° 50' 28'' N 2° 43' 04'' W

Tabla IV.1: Características morfométricas de los embalses de Arcos, Zujar, Cazalegas, Rosarito, Puentes Viejas, El Atazar y Cuerda del Pozo. V = Volumen, Prof. = profundidad y Max. = máxima. La profundidad media fue obtenida por medio del cociente del Volumen máximo entre el área máxima.



3.2. Toma de muestras.

Durante los años 2002 al 2004 se analizaron todos los embalses objeto de estudio, durante el periodo típico de aparición de afloramientos tóxicos en los países templados del hemisferio Norte, de junio a noviembre. Estos 14 embalses se muestrearon un mínimo de seis veces por año, y al menos durante un año, excepto El Atazar y Puentes Viejas que se muestrearon dos y tres veces respectivamente.

Se tomaron muestras de la fracción sestónica en todos los embalses estudiados. La metodología de muestreo en los embalses de de Lozoya, Río Sequillo, El Vellón, Santillana, Valmayor, San Juan y Picadas, Puentes Viejas y El Atazar fue la misma que se ha descrito en el capítulo II. En el resto de los embalses, excepto en el de Zujar, las muestras se tomaron en la columna de agua del embalse, con una botella hidrográfica en el pico máximo de clorofila detectado con una sonda de fluorescencia sumergible, YSI 6025 (YSI incorporated, Estados Unidos) acoplada a la sonda multiparamétrica YSI 6920. En el caso del embalse de Zujar la muestra de agua fue tomada en una piscina artificial utilizada como zona de baño. Las muestras se guardaron a 4 °C hasta su procesamiento, típicamente antes de cuatro horas, en botes de polipropileno de boca ancha, lavados con ácido clorhídrico.

3.3. Análisis de especies cianobacterianas planctónicas presentes potencialmente tóxicas.

Las muestras se procesaron de dos formas diferentes: las de los embalses de Lozoya, Río Sequillo, El Vellón, Santillana, Valmayor, San Juan y Picadas, Puentes Viejas y El Atazar, se analizaron como se ha descrito en el capítulo I. En el resto de los embalses una submuestra de 100 mL se fijó inmediatamente con Lugol ácido. En el laboratorio las células presentes fueron sedimentadas y contadas en un microscopio invertido usando el método Utermöhl (Utermöhl 1958). La identificación de las especies cianobacterianas presentes se realizó según los siguientes autores ((Geitler 1932), (Desikachary 1959), (Komarek y Anagnostidis 1989); (Komarek y Anagnostidis 1999) y (Komarek y Anagnostidis 1986)).



La diferencia entre los métodos utilizados no permite la comparación directa entre los diferentes embalses. Para homogeneizar los datos se realizó una clasificación relativa agrupando la presencia de cianobacterias en **dominantes** (cuando representaron el 40% de la población de las cianobacterias planctónicas), **subdominantes** (cuando representaron entre el 40 y el 10%) y **raras** (cuando su presencia fue inferior al 10%). Se consideraron especies potencialmente tóxicas todas aquellas especies pertenecientes a un género en el que se ha encontrado al menos una especie productora de anatoxina-a, estos han sido: *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* y *Raphidiopsis*.

3.4. Extracción y análisis de Anatoxina.

Las muestras para análisis de anatoxina fueron conservadas a 4 °C hasta que se filtraron a través de filtros GF/F (Whatman, Gran Bretaña) de 47 mm de diámetro, con un valor nominal de tamaño de partícula retenida de 0,7 µm. Para la filtración se utilizó una rampa de filtración de aluminio (Pall corp., Estados Unidos) y una bomba de vacío Me 4P (Vacuubrand GMBH, Alemania) a baja presión, con el fin de evitar la rotura celular. El volumen de filtración fue de 300 a 1000 mL en función de la biomasa presente. Las muestras filtradas en campo (los embalses situados fuera de la provincia de Madrid) se mantuvieron en nieve carbónica (-50 °C) hasta su llegada al laboratorio, momento en que se guardaron a -20 °C.

La extracción de anatoxina se realizó en metanol puro (Grado analítico, Merck). El filtro fue introducido en un tubo de centrifuga, al que se añadieron 4 mL de la solución de metanol 100%, después se agitó en un vortex Reax 2000 (Heidolph, Alemania) a máxima velocidad durante 2 min., a continuación fue introducida en un baño de ultrasonidos Ultrasons (J.P.Selecta, España) durante 10 minutos y posteriormente se guardó a 4 °C durante 1 hora. Finalmente fue centrifugada a 5000 rpm en una centrífuga Labofuge Ae, equipada con un rotor basculante (Heraeus Sepatech, Alemania) y se retiró el sobrenadante. Este proceso fue repetido una vez más añadiendo otros 3 mL de metanol 90%. Los dos sobrenadantes se conservaron a -20° C antes de concentrarse.



La concentración de la muestra se realizó en dos pasos, en un primer paso la muestra se llevó a sequedad con un rotavapor modelo R (Büchi, Suiza) a 40° C y se resuspendió en un volumen de 2 mL de metanol 100%, este volumen se introdujo en un eppendorf, que posteriormente se concentró en una centrifuga concentradora modelo Howe girovap GL (Girovap, Italia), también a 40 °C. Finalmente se resuspendió en un volumen 400 µL. Doscientos µL del resuspendido final se pasaron a través de un filtro de nylon y se introdujeron en un vial de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) para su análisis.

El análisis de las muestras para detectar la presencia de anatoxina fue realizado con un HPLC modelo 2695 “Alliance”, con un inyector automático y un detector con un conjunto de diodos modelo 996 (Waters, Estados Unidos). Para la separación cromatográfica se utilizó el gradiente descrito por Edwards y col. 1992 modificando la concentración del aditivo TFA (ácido trifluoro-acético) de 0,1% a 0,05% utilizando agua miliQ + 0,05% TFA y acetonitrilo + 0,05% TFA. La columna utilizada fue una Luna (2) (3 µm) 4.6 mm x 100 mm (Phenomenex, Estados Unidos). La anatoxina-a se identificó por su espectro de absorción en UV y su tiempo de retención comparándolo con la del patrón de anatoxina-a (Tocris, Inglaterra) (Figura IV.11 y IV.12). La concentración fue calculada relacionando el área obtenida a 228 nm con la cantidad inyectada del patrón.

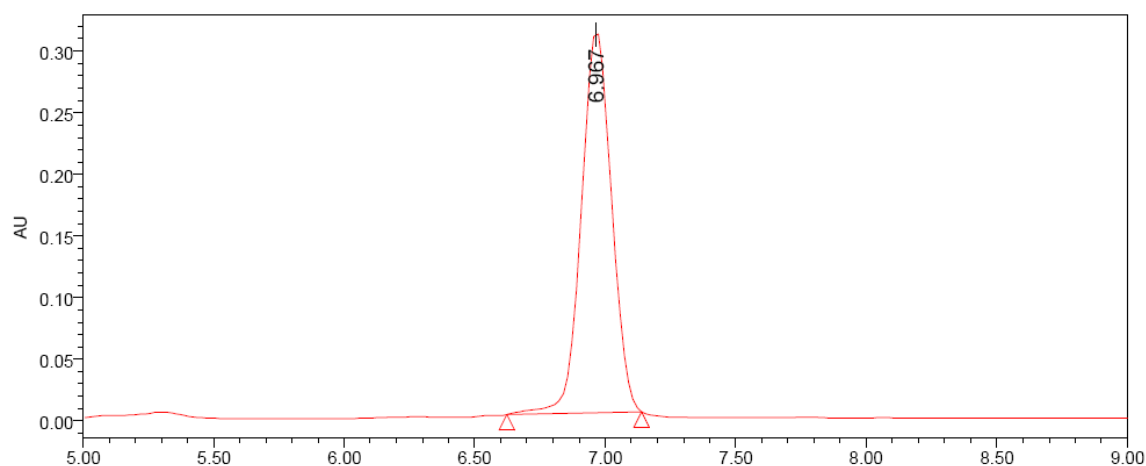


Figura IV.11. Ejemplo de inyección de patrones de anatoxina-a.

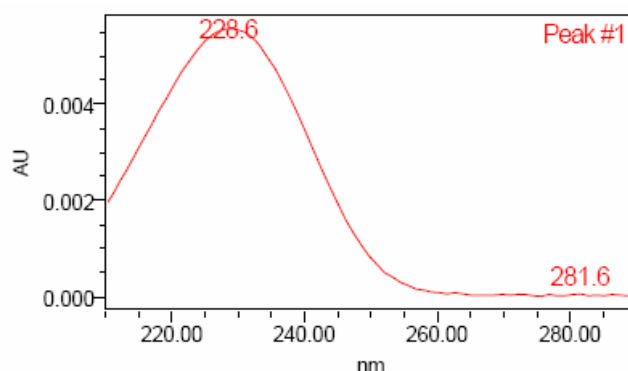


Figura IV.12. Espectro de absorción característico de la anatoxina-a.

Aparte del análisis por HPLC, para algunos de los picos con características similares a la anatoxina-a se realizó un análisis por espectrometría de masas en el SIDI (Servicio Interdepartamental de Investigación, UAM). Para ello se purificó el pico de interés en el mismo sistema cromatográfico utilizado para su análisis y posteriormente se inyectó en un espectrómetro de masas QSTAR (Applied Biosystems, Estados Unidos) con un interfaz por electrospray, con el fin de obtener el espectro de masas y compararlo con las variantes de anatoxina-a publicadas.



4. Resultados.

Se han analizado tanto las especies cianobacterianas presentes en los 14 embalses objeto de estudio como la presencia de anatoxina-a en cada uno de ellos. La idea inicial era conocer la extensión e importancia que tienen las anatoxinas en los embalses españoles. En principio se seleccionaron los embalses o bien por la actividad recreativa que tenía lugar en ellos o bien por su utilización como fuentes de abastecimiento de agua potable. En cualquiera de estas dos formas es posible el contacto entre los seres humanos y este tipo de toxinas.

4.1. Presencia de cianobacterias potencialmente productoras de anatoxina-a en embalses españoles.

Cuando analizamos las especies de cianobacterias en los 14 embalses objeto de estudio, podemos observar que en todos ellos se detectaron especies pertenecientes a alguno de los géneros para los cuales se ha detectado alguna especie productora. Cuando analizamos las diferentes muestras observamos que un gran porcentaje de las muestras (el 81% de las 248 muestras analizadas) presentaba especies potencialmente productoras de anatoxina-a. En general el 70% de las muestras de cada embalse presentaron géneros potencialmente productores de anatoxina, salvo en el embalse de Zujar en las que sólo un 20% de las muestras presentaron especies potencialmente productoras. Estudiando más detenidamente los valores encontrados observamos que fue común encontrar más de una especie potencialmente productora, la media de especies por muestreo fue de 1,9 lo que indica que en la mayor parte de ellos al menos coexistieron dos especies potencialmente productoras de anatoxina-a simultáneamente, como puede apreciarse tras comparar los datos de número de veces que aparecen las diferentes especies de cianobacterias potencialmente productoras de anatoxina Tabla IV.2 frente al número de muestreos realizados.

Cuando analizamos los géneros cianobacterianos que se han encontrado en los cuerpos de agua en estudio, observamos que se han detectado cuatro géneros potencialmente productores, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Planktothrix* y *Raphidiopsis*. La importancia de cada uno de los géneros en cuanto a su abundancia en los embalses españoles ha sido muy variable.



De todos los géneros *Aphanizomenon* y *Anabaena* han sido los más importantes, tanto por el número de especies detectadas, como por el número de muestras en las que estuvieron presentes. Además alguna especie de uno de estos géneros ha estado presente siempre que se han detectado potenciales productores. Mientras los otros dos géneros pueden considerarse marginales al detectarse en 23 muestras (menos del 10% de las muestras) en el caso de género *Planktothrix* y en sólo siete ocasiones el género *Raphidiopsis* (menos del 3% de las muestras).

A nivel de especie, hemos encontrado 14 especies potencialmente productoras (Tabla IV.2), a parte de las nombradas en el párrafo anterior, 2 del género *Planktothrix* y una del género *Raphidiopsis*. En nueve de las muestras no fue posible identificar a nivel de especie alguna de las *Anabaena* presente y en otra no fue posible identificar la especie de *Planktothrix*. De todas las especies encontradas las más comunes fueron *Aphanizomenon flos-aquae* que estuvo presente en 118 de las muestras, lo que representa el 47,9% de las muestras, después muy alejados estuvieron el resto de las especies de *Aphanizomenon* que se encontraron entre el 1,6% de las muestras en el caso del *Aphanizomenon* menos representado (*Aph. yezoenese*) hasta el 6,8% de la segunda especie mas importante (*Aph. flexuosum*) (Tabla IV.2).

Cuando analizamos los géneros y especies que fueron dominantes, observamos que *Anabaena* fue el género de las cianobacterias planctónicas más importante dentro de los embalses estudiados al encontrarse en conjunto en el mayor porcentaje de las muestras dominadas por un organismo potencialmente productor. 19% de las muestras estuvieron dominadas por *Anabaena*, mientras que el 14% de las muestras estuvieron dominadas por *Aphanizomenon*. Las tres siguientes especies potencialmente productoras más importantes fueron del género *Anabaena*: *A. flos-aquae*, *A. planktonica* y *A. crassa* que estuvieron en el 37,5 %, 22,2 % y 17,7 % respectivamente de las muestras. La cuarta de las especies de *Anabaena* identificada *A. sigmoidea* apareció en menos del 1% de las muestras totales (Tabla IV.2). *Planktothrix* se presenta en baja proporción siendo más importante la especie *P. agardhii*, presente en el 7,7 % de las muestras, que la especie *P. rubescens* que sólo estuvo presente en el 1% de las muestras. Dentro del género *Raphidiopsis* sólo se encontró una especie *R. mediterranea* que siempre estuvo por debajo del 10% de abundancia y por lo tanto puede ser catalogada como rara.



Especies	Dominante	Subdominante	Rara	% de muestras en las que se encontró
<i>Anabaena crassa</i> (Lemmermann) Komark.-Legn. & Cronberg.	8	2	34	17,7
<i>Anabaena flos-aquae</i> (Lyngbye) Brébisson ex Bornet & Flauhault.	22	12	59	37,5
<i>Anabaena planctonica</i> Brunnthaler.	14	9	32	22,2
<i>Anabaena</i> spp.	2	0	7	3,6
<i>Anabaena sigmoidea</i> Nygaard.	0	0	2	0,8
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (Linnaeus) Ralfs ex Bornet & Flahault	23	20	75	47,6
<i>Aphanizomenon yezoense</i> M. Watanabe	2	2	0	1,6
<i>Aphanizomenon gracile</i> Lemmermann	4	3	0	2,8
<i>Aphanizomenon flexuosum</i> J. Komárek & L. Kovácik	3	8	6	6,9
<i>Aphanizomenon ovalisporum</i> Forti	3	3	2	3,2
<i>Aphanizomenon issatschenkoi</i> (Usacev) Proshkina-Lavrenko	0	5	2	2,8
<i>Planktothrix agardhii</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek	4	11	4	7,7
<i>Planktothrix rubescens</i> (De Candolle ex Gomont) Anagnostidis & Komárek	1	0	2	1,2
<i>Planktothrix</i> sp.	0	0	1	0,4
<i>Raphidiopsis mediterranea</i> Skuja	0	0	7	2,8

Tabla IV.2: Especies potencialmente productoras de anatoxina-a encontradas en los embalses objeto de estudio. Dominante, la especie presente representa al menos el 40% de la población cianobacteriana planctónica total. Subdominante entre el 40% y el 10%. Rara, representa menos del 10%.



4.2. Presencia de anatoxina-a en embalses españoles.

De los 14 embalses analizados sólo en uno de ellos, el embalse de Rosarito, se ha encontrado anatoxina-a. En otro de ellos, el de Santillana, se ha encontrado un compuesto similar en cuanto a tiempo de retención en la separación cromatográfica y el espectro de absorción que presenta.

4.2.1. Presencia de anatoxina en el embalse de Santillana.

Durante los muestreos realizados en el embalse de Santillana en los años 2002 y 2003, como hemos podido observar en los capítulos I y II, la presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas ha sido muy importante. Durante el año 2002, entre los meses de septiembre y noviembre, tuvo lugar un periodo en el cual las cianobacterias potencialmente tóxicas fueron muy abundantes alcanzándose en varios momentos picos de clorofila por encima de los $100 \mu\text{g Clo } a \text{ L}^{-1}$ y concentraciones de microcistina también muy elevadas por encima de $10 \mu\text{g Mc L}^{-1}$ (capítulo II). Como ya hemos descrito en el capítulo I, durante este periodo, la población planctónica de cianobacterias estuvo dominada fundamentalmente por *M. aeruginosa* y por *Aph. flos-aquae*. Cuando se analizaron las muestras se detectó un pico con un espectro muy similar (Figura IV.13) y un tiempo de retención muy cercano al patrón de anatoxina-a (se alejaba 0,2 min) (Figura IV.14), tanto que debido a la variación en el tiempo de retención que el sistema presenta, el pico de la muestra tenía el mismo tiempo de retención que los patrones pinchados en otros días (datos no mostrados).

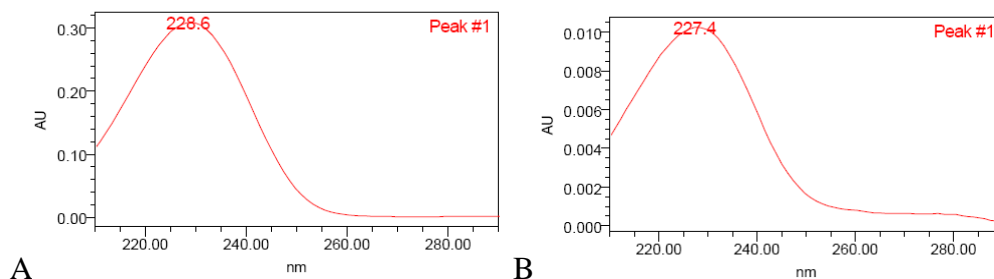


Figura IV.13: Espectros del Patrón de la anatoxina-a y de pico encontrado en Santillana en el año 2002. A = espectro del patrón de Anatoxina-a, B = espectro de la muestra de Santillana.

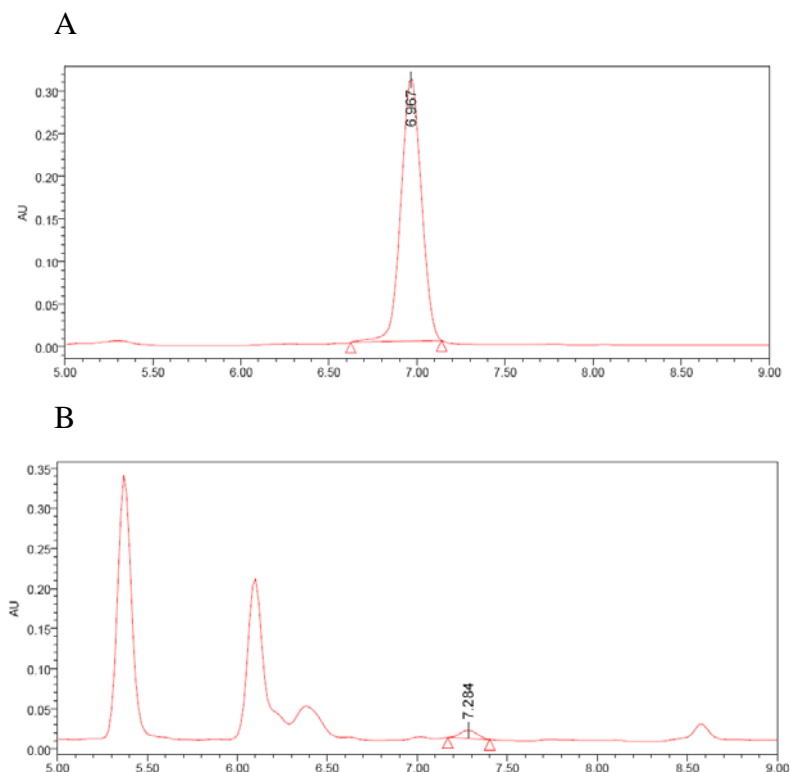


Figura IV.14: Cromatogramas de la anatoxina-a y del pico aparecido en el embalse de Santillana en el año 2002. A = cromatograma del patrón de Anatoxina-a, B = cromatograma de la muestra de Santillana.

Al igual que se hizo con las variantes químicas de microcistinas para las cuales no se disponía de patrón, se hizo un cálculo de concentración como equivalentes de anatoxina-a del cual si existe patrón comercial. Este compuesto apareció de forma repetida en los dos puntos opuestos del embalse de Santillana en tres muestreos entre el 3 de septiembre y el 20 del mismo mes, coincidiendo con un momento en que la presencia de *Aphanizomenon flos-aquae* era muy abundante en la población, las relaciones entre este compuesto y la clorofila en estos tres muestreos pueden verse en la Tabla IV.3. Como podemos observar, se alcanzaron valores del 15% de la clorofila presente, lo que se considera una alta concentración.



Fecha	$\mu\text{g ANA}(\text{eq}) \mu\text{g Clo } a^{-1}$	SD
3-9-2002	0,049	0,005
6-9-2002	0,078	(sólo se muestreo el punto S2)
12-9-2002	0,151	0,054

Tabla IV.3. Presencia del Compuesto similar a Anatoxina-a en el embalse de Santillana. ANA(eq) = anatoxina equivalente, SD = desviación estándar de dos puntos opuestos del embalse.

Debido a la similitud que presentaban estos picos se procedió al aislamiento del pico de interés a través del mismo sistema cromatográfico utilizado para el análisis de anatoxina-a y la muestra obtenida se inyectó en un espectrómetro de masas con el fin de determinar tanto su masa molecular, como su posible espectro de fragmentación, para poder compararla con los datos existentes para las variantes químicas de la homoanatoxina-a. El espectro de masas obtenido puede observarse en la Figura IV.15, en esta misma figura podemos observar el aspecto de la anatoxina-a del patrón sometida al mismo tratamiento que el pico de interés.

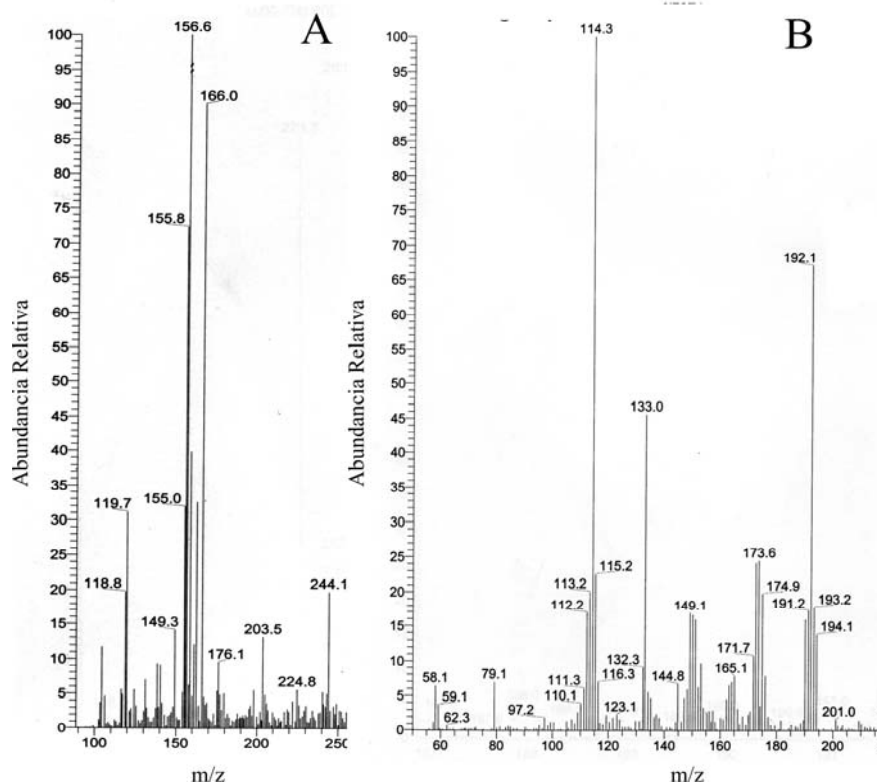


Figura IV.15. Espectro de masas de la anatoxina-a (A) y del pico encontrado en el embalse de Santillana (B).



Como podemos observar no existen similitudes entre la anatoxina-a y el pico encontrado en el embalse de Santillana, en el espectro de anatoxina-a podemos observar claramente un compuesto de masa más uno de la anatoxina-a (la anatoxina-a protonada). Mientras que en el caso del compuesto desconocido no aparece ninguno de los fragmentos que debíamos esperar en caso de encontrarnos ante un compuesto perteneciente a la misma familia, lo que parece indicar que no pertenece a esta familia de toxinas.

4.2.2. Presencia de anatoxina-a en el embalse de Rosarito.

El embalse de Rosarito es el único de los 14 analizados que ha presentado concentraciones de anatoxina-a por encima del límite de detección ($0,02 \mu\text{g L}^{-1}$), esto se confirmó tanto por el tiempo de retención y espectro, como realizando un “spike” con el estándar de anatoxina-a. Este embalse fue muestreado durante el año 2003 en seis ocasiones entre los meses de julio y octubre.

La población fitoplanctónica del embalse de Rosarito estuvo dominada por cianobacterias en todas las ocasiones (representaron al menos el 80% de la población fitoplanctónica total), salvo en el último muestreo de octubre que solo representaron menos del 30% de la población (). Dentro de la población planctónica cianobacteriana las especies potencialmente productoras de anatoxina-a más importantes fueron: *Aph. gracile*, *P. agardhii* y *A. flos-aquae* (figura IV.16), encontrándose además *R. mediterranea* de manera constante a lo largo del periodo de muestreo pero en bajas concentraciones con una media de $66,7 \pm 81,4 \text{ mm}^3 \text{ m}^{-3}$.

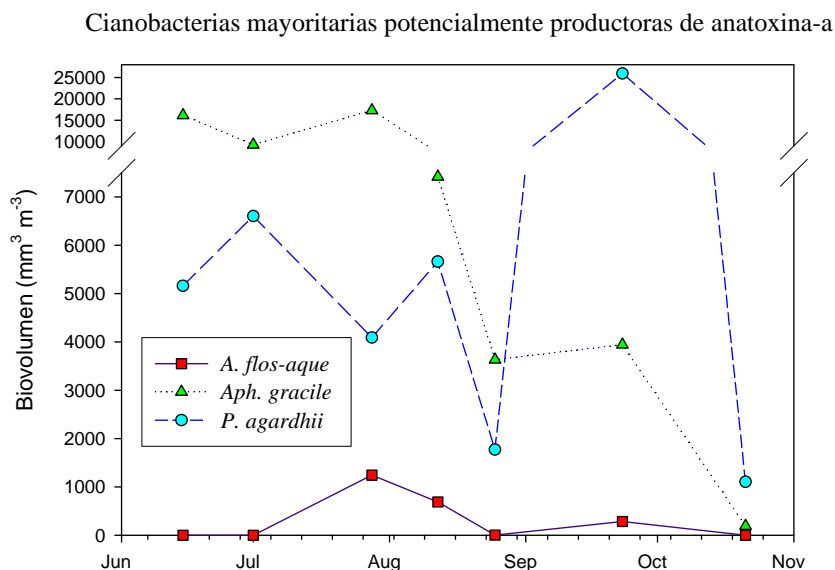


Figura IV.16: Biovolumen de cianobacterias mayoritarias potencialmente productoras de anatoxina-a en el embalse de Rosarito.

Cuando analizamos la presencia de anatoxina-a en las muestras analizadas observamos que se detectaron en cuatro ocasiones (Tabla IV.4). La mayor concentración encontrada (a finales de Septiembre) fue de $0,31 \mu\text{g L}^{-1}$, el mínimo se encontró un mes antes siendo un orden de magnitud inferior, $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$. Las relaciones toxina/clorofila siguen tendencias similares con valores máximos del 0,3 %.

Fecha	$\mu\text{g ANA L}^{-1}$	$\mu\text{g ANA } \mu\text{g Clo } a^{-1}$
28-7-2004	0,23	$4,2 \cdot 10^{-3}$
12-8-2004	0,17	$3,1 \cdot 10^{-3}$
26-8-2004	0,04	$4,4 \cdot 10^{-4}$
23-9-2004	0,31	$3,4 \cdot 10^{-3}$

Tabla IV.4. Concentraciones de anatoxina (ANA) encontradas en el embalse de Rosarito.



5. Discusión

De los datos expuestos en este capítulo podemos observar que a pesar de lo común que es la presencia de estirpes potenciales productoras de anatoxina-a en los embalses españoles, la toxina en si misma puede considerarse rara, puesto que sólo ha sido posible detectar su presencia en uno de los quince cuerpos de agua analizados.

Existen muy pocos trabajos acerca de la importancia que tienen las cianobacterias potencialmente tóxicas en los cuerpos de agua mediterráneos, y en particular de los géneros que potencialmente son capaces de producir anatoxina-a u homoanatoxina-a (Cook y col., 2004). En ese trabajo, centrado casi exclusivamente en las potenciales productoras de microcistinas, podemos observar que entre las especies dominantes en lagos griegos, es común la presencia de organismos potencialmente productores de anatoxinas, principalmente especies pertenecientes a los géneros *Aphanizomenon*, *Anabaena*, siendo especialmente importantes dos especies en esta zona: *Aph. flos-aquae*, y *A. flos-aquae*, si bien no es posible aventurar que ocurra lo mismo en el resto de la región mediterránea. Cuando analizamos las especies potencialmente productoras de anatoxina más comunes en España, observamos que coinciden con las encontradas en Grecia, siendo las especies más abundantes *Aph. flos-aquae*, y *A. flos-aquae* en ambos países. Esta coincidencia y la gran distancia que separa a las dos zonas estudiadas, parece indicar que estas dos especies podrían ser las potenciales productoras de anatoxinas más importantes en toda la zona mediterránea.

Cuando comparamos los datos de especies potencialmente productoras de anatoxinas encontrados en España con los encontrados en el resto de Europa, observamos que los resultados obtenidos son más homogéneos que los encontrados respecto a las especies potencialmente productoras de microcistinas. Como ha sido publicado en diversas ocasiones, ((Carrasco y col., 2006) y (Willame y col., 2005)) parece existir un gradiente norte-sur en cuanto a cuáles son los géneros cianobacterianos responsables de la producción de microcistinas (*Anabaena* en Escandinavia, *Planktothrix* en Centro Europa, y *Microcystis* en la zona mediterránea). No obstante, en cuanto a los potenciales productores de anatoxina este gradiente no parece existir. En este caso encontramos una distribución bastante homogénea de



los potenciales productores en toda Europa ((Sivonen y col., 1989); (Bumke-Vogt y col., 1999) y (Cook y col., 2004)), así pues son *Anabaena* y *Aphanizomenon*, los principales potenciales productores tanto en la zona mediterránea, como en el resto de Europa, si bien no puede descartarse la importancia de *Planktothrix* en Europa central.

El embalse de Santillana en el año 2002 presentó en tres ocasiones un compuesto con características cromatográficas similares (tiempo de retención, y espectro de absorción) a la anatoxina-a. Sin embargo análisis posteriores por espectrometría de masa, mostraron un espectro de masas completamente diferente a cualquier variante de anatoxina conocida (James y col., 2005), confirmando que no se trataba de la homoanatoxina-a como se sospechó en un primer momento puesto que parecía ligeramente más hidrofóbica (poseía un tiempo mayor en la separación cromatográfica), lo que sería coherente con el cambio de un grupo metilo por un grupo etilo que diferencia a las dos moléculas. La existencia de estos picos con características cromatográficas similares a la anatoxina-a dificultan la determinación, al no disponer de manera comercial, de los compuestos derivados de anatoxina o sus variantes, como la homoanatoxina-a. Siendo necesario en este un análisis de HPLC-MS mucho mas caro y difícil de realizar que el clásico análisis por HPLC-PDA.

Mientras, en el embalse de Rosarito si fue posible detectar en cuatro ocasiones la presencia de un compuesto, identificado como anatoxina-a tanto por su tiempo de retención como por sus características cromatográficas. Además, en los momentos de mayor concentración de anatoxina-a se observó que la muestra era tóxica para *Artemia salina*, lo que ayudaría a confirmar la presencia de esta toxina en las muestras analizadas (datos no mostrados). Cuando comparamos la presencia de este compuesto en nuestro trabajo con los datos publicados en otros países de la zona mediterránea observamos que sólo se tienen datos de dos cuerpos de agua italianos ((Bruno y col., 1994a) y (Viaggiu y col., 2004a)), y no existe ningún análisis a escala nacional, como ocurre en otros países europeos y asiáticos como Alemania (Bumke-Vogt y col., 1999), Corea (Park y col., 1998), Finlandia (Sivonen y col., 1989) e Irlanda (James y col., 1997), si bien en este ultimo país solo se analizaron 5 lagos. Al comparar los datos, y a pesar de las diferentes metodologías, que al presentar diferentes limites de detección (desde 0,0002 $\mu\text{g ANA L}^{-1}$ en el caso de Alemania (Bumke-Vogt y col., 1999), y alrededor de 0,02 $\mu\text{g ANA L}^{-1}$ en el resto) dificultan la comparación. Los datos



encontrados en la bibliografía se pueden dividir en dos grandes grupos, por un lado nos encontraríamos un primer grupo que englobaría a Alemania, Irlanda y Corea, que muestran una elevada presencia de anatoxina-a en sus cuerpos de agua, alrededor del 20% (o superiores, como es el caso de Irlanda, donde 3 de los 5 embalses analizados presentaban anatoxinas) de los mismos analizados presentarían este tipo de compuestos. Mientras en un segundo grupo nos encontraríamos a España y a Finlandia (aunque este último no indica cual es el número de embalses que presentaron anatoxina, pero sí indica el porcentaje de muestras que dieron positivas, el 5%) donde la presencia de anatoxinas es mucho menor. Este segundo grupo representaría a los países en los cuales la presencia de este tipo de compuestos puede calificarse como rara, de hecho en los embalses españoles como hemos indicado en resultados sólo el 7% de los embalses (sólo el embalse de Rosarito), o expresado en función del número total de muestras analizadas el 2% presentaron anatoxinas. Estos valores tan alejados de los presentes en el primer grupo, nos hace creer que existe un gradiente en Europa, que se correlacionaría con la presencia de cepas genéticamente diferentes, puesto que como hemos indicado con anterioridad las especies productoras se encuentran bastante homogéneamente distribuidas por toda Europa. Así los extremos norte y sur del Continente (Escandinavia y la zona mediterránea) presentarían una prevalencia de este tipo de toxinas muy baja, mientras que en Europa central y quizás en Asia, sin ser tan alta como en el caso de la microcistina ((Carrasco y col., 2006) y (Sivonen y Jones 1999)), si parecen ser abundantes en sus lagos y embalses y por lo tanto pueden considerarse como toxinas comunes.

Las diferencias existentes entre las diferentes zonas europeas, pueden explicarse como hemos indicado en el párrafo anterior en base a la existencia de diferentes cepas de las principales especies productoras, especialmente *Anabaena flos-aquae*. Como quedó claro en el trabajo de (Kangatharalingam y Priscu 1993) en el que demostraron que sólo un porcentaje muy bajo de los clones aislados en un momento puntual del lago Hegben, concretamente alrededor del 8,7%, eran capaces de producir anatoxina-a. Estos datos parecen indicar que en los países centroeuropeos los genotipos productores de anatoxina-a son mucho más frecuentes que en los países mediterráneos como ocurre con la especie *Anabaena circinalis* y la producción de saxitoxinas (Beltran y Neilan 2000), si bien la falta de estudios al respecto impiden confirmar esta hipótesis. Por otro lado, podría darse la posibilidad de la existencia de cepas productoras que son capaces de producir mayor cantidad de toxina, como ocurre en



cepas de la especie *M. aeruginosa* (Moreno y col., 2004), que influirían en la variación de las concentraciones finales de toxina detectadas.

Estas diferencias se ven no sólo en el número de embalses que presentan este tipo de toxinas, si no también en el porcentaje de muestras que las presentan, sin comparar los datos encontrados en Alemania (Bumke-Vogt y col., 1999), que presentaron un límite de detección un orden de magnitud inferior al sistema utilizado en este trabajo, y por lo tanto sus porcentajes no pueden ser comparados directamente, en los otros países donde el método presenta límites de detección similares al nuestro, las diferencias son importantes. En Corea, el 16% de las muestras fueron positivas y en Irlanda el 60% fueron positivas ((Park y col., 1998) y (James y col., 1997)). Si bien originalmente el número de muestras analizadas en Irlanda fue muy bajo (solo 5 muestras analizadas), los datos de la importancia de estos compuestos fueron confirmados posteriormente en un estudio más extenso, analizando 20 cuerpos de agua, sobre la presencia de la homooanatoxina-a (Furey y col., 2003) un compuesto considerado más raro que la anatoxina-a y perteneciente a la misma familia química, el cual se encontró en el 20% de los embalses analizados. Este alto porcentaje de presencia de este compuesto indica que probablemente la anatoxina-a se encuentra en valores aún superiores a los encontrados para la homooanatoxina, confirmando los datos de anatoxina, a pesar del bajo número de embalses estudiados.

No sólo existen grandes variaciones dentro del número de embalses y muestras que tienen anatoxina-a, también existen grandes diferencias en las concentraciones que presentan, de hecho las concentraciones encontradas en los países centroeuropeos son de hasta tres órdenes de magnitud a las encontradas en España, con concentraciones superiores a 10 µg ANA L⁻¹ en Alemania (Bumke-Vogt y col., 1999) y a 400 µg ANA L⁻¹ en Irlanda (James y Sherlock 1996). Aquí la mayor concentración medida en el embalse de Rosarito fue de 0.31 µg l⁻¹. En los otros dos países (Corea (Park y col., 1998) y Finlandia (Sivonen y col., 1989)), las concentraciones fueron calculadas por peso seco y no por litro, lo que impide compararlas directamente con las obtenidas en este trabajo.



Analizando en mayor profundidad el embalse de Rosarito, podemos apreciar que en todos los momentos en los que apareció la anatoxina-a existían al menos cuatro organismos que han sido descritos como potenciales productores de este compuesto. Esta presencia dificulta la identificación del principal organismo productor, sobre todo porque no se realizó ningún aislamiento de las cianobacterias presentes en los momentos en los que apareció la anatoxina-a, este aislamiento hubiera permitido identificar el organismo productor. Esto nos obliga a conjeturar acerca del posible productor en función de las concentraciones de toxinas encontradas en cada momento y el biovolumen de los posibles productores. En el embalse de Rosarito como hemos indicado en Resultados se han encontrado 4 posibles productores de anatoxina-a en cada momento en que esta apareció: *A. flos-aquae*, *Aph. gracile*, *P. agardii* y *R. mediterranea*. Si bien la diferencia en el biovolumen que representó cada una de ellas fue muy grande y la única que estuvo sólo presente en todos los momentos en los que se detectó la toxina fue *A. flos-aquae*. Otros indicios acerca de que es este organismo el principal responsable de la producción de anatoxina-a, son que las variaciones en la concentración de esta toxina y de los biovolúmenes de los posibles productores se ajustan mejor en el caso de la *A. flos-aquae* que con el resto de especies y finalmente que si expresamos la concentración de anatoxina-a en función del biovolumen de las especies productoras, para *Anabaena* obtenemos valores en el rango de $0,2 - 1,1 \mu\text{g ANA mm}^{-3}$, similares a los encontrados por (Bumke-Vogt y col., 1999) en el lago Langer, mientras que en el caso de los otros organismos obtenemos valores mucho más alejados de los obtenidos en ese trabajo. A pesar de estos indicios no podemos descartar que existan otros posibles productores que coexistan especialmente *R. mediterranea*, descrita como productora y que por su bajo biovolumen podría ser responsable de un pequeño incremento de la toxina en los momentos en que se ha detectado. Mientras que *Planktothrix* y *Aphanizomenon* presentan elevados biovolúmenes durante todo el tiempo, y por ello debería haberse detectado la presencia de anatoxina-a durante todo el periodo de muestreo, si bien la existencia de una pequeña sub-población productora dentro de estos grupos no puede descartarse.



CAPÍTULO V



Cilindrospermopsina en un embalse español: El embalse de Arcos.

1. Introducción

Durante el desarrollo de esta tesis hemos hablado de la importancia de diversos compuestos tóxicos producidos por las cianobacterias. En este capítulo trataremos de uno de los últimos en identificarse: la cilindrospermopsina. Este compuesto merece atención especial, puesto que junto con las microcistinas, son las únicas toxinas que han causado fenómenos masivos de intoxicación en poblaciones humanas. Además, hasta hace poco no se había detectado una elevada presencia en aguas europeas, con lo que aún en la actualidad se desconoce cual es la importancia que presenta esta toxina en los cuerpos de agua europeos, y si puede llegar a alcanzar concentraciones elevadas que puedan representar un riesgo para la población y para los ecosistemas.

1.1. Estructura química de la cilindrospermopsina y biosíntesis.

Químicamente la cilindrospermopsina es un derivado guanidino combinado con un hidroximetiluracilo (Figura V.I), es una toxina alcaloidea de pequeño tamaño, con un peso molecular de 415 Da, (Sivonen y Jones 1999). Se conocen dos variantes de esta molécula, una es la 7-epi-cilindrospermopsina que es un esteroisómero en el grupo hidroxilo del carbono 7, el que une el grupo guanidino con el hidroximetiluracilo. La otra variante de esta toxina, la deoxicilindrospermopsina, que se caracteriza por la sustitución en su fórmula molecular de un grupo OH por un hidrógeno en el carbono número 7, este último compuesto no ha mostrado toxicidad (Norris y col., 1999).

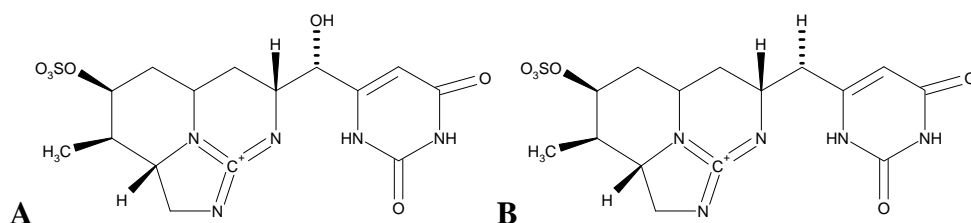


Figura V.I. Estructura química de la cilindrospermopsina (A) y la deoxycilindrospermopsina (B).

Respecto a la síntesis de este tipo de compuestos, se han propuesto los posibles genes responsables de la síntesis de la cilindrospermopsina, así como una posible ruta de síntesis ((Schembri y col., 2001) (Shalev-Alon y col., 2002)). Son tres los genes que se han sido predichos como responsables de la síntesis de cilindrospermopsina *AoaA*, *AoaB* y *AoaC*, que codifican para una actividad amino transferasa, un híbrido de péptido sintetasa y poliquétido sintasa y una poliquétido sintetasa respectivamente. La Figura V.II muestra la ruta hipotética de síntesis de este compuesto. En esta ruta la proteína *AoaA* es una amidinotransferasa que cataliza la síntesis del acetato de guanidinio, unidad inicial de la síntesis de la cilindrospermopsina (Burgoyne y col., 2000). Este compuesto es reclutado por las otras dos enzimas *AoaB* y *AoaC*. La primera de ellas reconoce por medio del dominio de adenilación al guanidinio, de hecho este parece ser el único dominio de adenilación que reconoce a este compuesto teniendo muy baja similitud con los otros dominios de adenilación conocidos (menos del 40%). Esta proteína junto con la enzima *AoaC* parecen ser los responsables de la ampliación de la cadena poliquetídica mediante la incorporación de malonil-CoA, hasta llegar finalmente a la síntesis de la cilindrospermopsina (Kellmann y col., 2006). Hasta el momento no se ha inactivado este operón en ninguna de las cepas productoras de cilindrospermopsina conocidas en la actualidad, con lo que falta la confirmación final de que estos son los genes responsables de la síntesis de cilindrospermopsina, aunque estos genes se han encontrado en cepas de las especies productoras: *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia natans*, *Aphanizomenon ovalisporum* y *Aphanizomenon flos-aquae* ((Schembri y col., 2001); (Shalev-Alon y col., 2002); (Kellmann y col., 2006); (Preussel y col., 2006)).

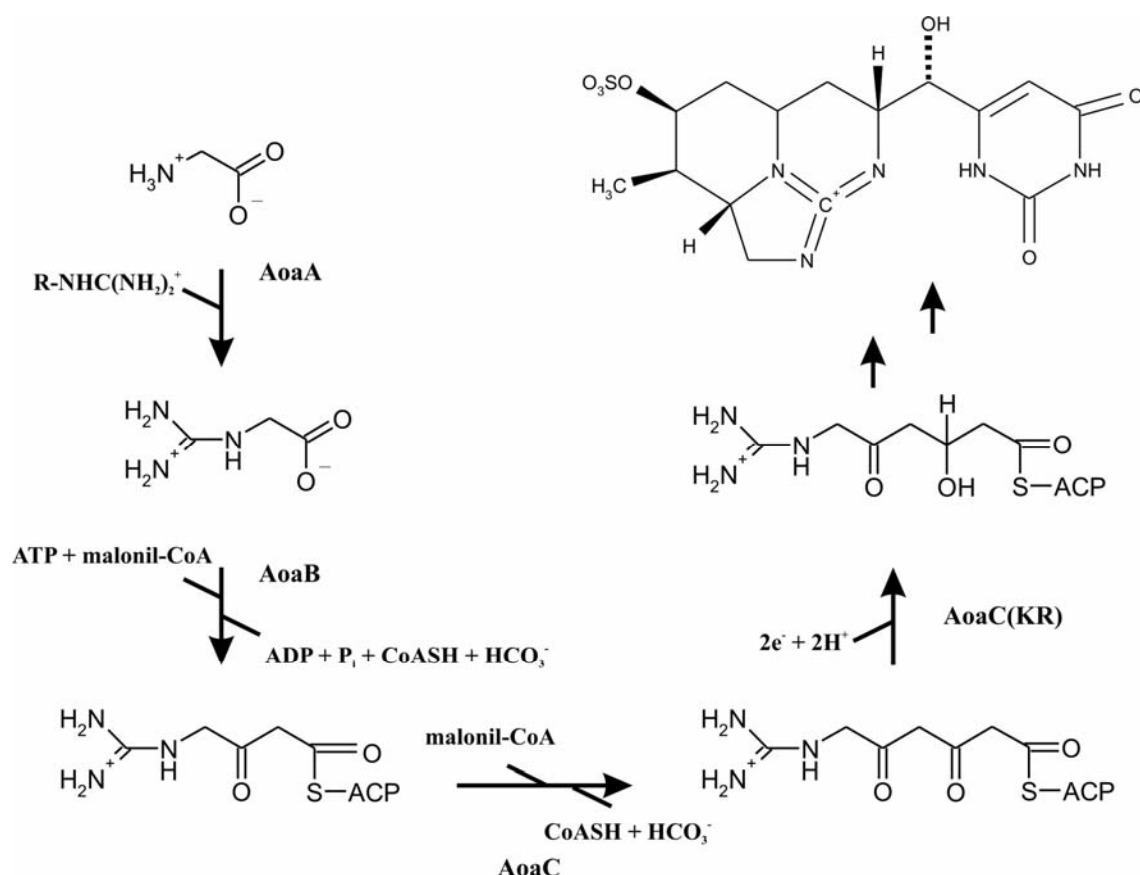


Figura V.II. Posible reacciones bioquímicas que realizan las tres posibles enzimas implicadas en la síntesis de cilindrospermopsina. Extraído de Kellmann y col., 2006.

1.2. Organismos productores.

El hecho de que, a pesar de estos efectos, la cilindrospermopsina no haya sido objeto de demasiados estudios se debe principalmente a su, hasta la fecha, escasa distribución geográfica. En este sentido, las principales especies potencialmente productoras eran consideradas tropicales, y se habían considerado raras en el continente europeo, y se habían centrado en zonas más cálidas

En Oceanía, la cilindrospermopsina se considera un agente tóxico merecedor de gran atención desde los años 80 al ser responsables de una intoxicación masiva en Palm Island y mostrar que uno de sus principales productores *C. raciborskii* era común en los



cuerpos de agua utilizados como fuentes de agua potable (Griffiths y Saker 2003). En Israel, obtuvo protagonismo cuando se detectó en la principal fuente de agua dulce del país, el lago Kinneret, en los años 90, donde se identificó al otro gran productor de cilindrospermopsina *Aph. ovalisporum* (Banker y col., 1997). Otras especies productoras son *Umezakia natans* (Harada y col., 1994), *Anabaena lapponica* (Meriluoto y Spoof 2005), *Raphidiopsis curvata* (Li y col., 2001) y recientemente se ha publicado la producción de esta toxina en una cepa de *Aph. flos-aquae* (Preussel y col., 2006), especie habitual en las aguas españolas como hemos podido ver en el Capítulo I y Capítulo IV, y en *Lyngbya wollei* (Seifert y col., 2007).

Las dos especies productoras fundamentales, tanto por distribución como por las elevadas concentraciones de toxina que se han encontrado asociadas a su presencia en los cuerpos de agua son *C. raciborskii* y *Aph. ovalisporum*. La primera de ellas podrían estar comportándose como una especie invasora. Este supuesto se ha establecido en los últimos años, ya que parece que existe una paulatina expansión geográfica hacia zonas más templadas (Briand y col., 2004). Aunque en el caso de las cepas de *C. raciborskii*, parece que existiría una segregación en cuanto a que tipo de toxinas producen mayoritariamente en función del continente donde se encuentran; así en el caso de las cepas aisladas en Oceanía, Asia y Norteamérica las cepas producen cilindrospermopsina como toxina más importante ((Bernard y col., 2003); (Berger y col., 2006); (Chonudomkul y col., 2004) y (Neilan y col., 2003)), mientras que en Europa hasta la fecha no se ha conseguido aislar ninguna cepa de esta especie productora de dicha toxina, aunque su carácter tóxico se ha evidenciado en bioensayo de ratón, siendo el compuesto o compuestos tóxicos de naturaleza desconocida. ((Fastner y col., 2003); (Valerio y col., 2005); (Bernard y col., 2003) y (Saker y col., 2003)). En el caso de *Aphanizomenon ovalisporum*, tras haberse visto recluido a zonas muy concretas, durante los últimos años se ha observado un patrón de expansión similar al de *C. raciborskii*, presentándose en varios países ((Banker y col., 1997); (Gkelis y col., 2005) y (Shaw y col., 1999)). De esta manera se aprecia como probable que las especies de este género puedan ser las principales productoras de cilindrospermopsina en aguas europeas ((Preussel y col., 2006); (Fastner y col., 2007) y (Quesada y col., 2006)).



1.3. Toxicidad de la cilindropermopsina.

Respecto a qué partes de la molécula son esenciales para la toxicidad, parece que el anillo de pirimidina es fundamental para la toxicidad, así como el OH situado en el carbono 7, puesto que como hemos indicado el tautómero deoxicilindropermopsina carece de toxicidad conocida, lo que indica que este OH en la unión puente entre el uracilo o quizás el estatus ceto-enol del motivo uracilo es crítico en la toxicidad (Griffiths y Saker 2003).

La cilindropermopsina fue inicialmente caracterizada como una hepatotoxina puesto que en estado puro se caracteriza por tener como órgano diana fundamentalmente el hígado, pero análisis posteriores utilizando extractos de *C. raciborskii* independientemente de la forma en que este extracto entra en el organismo, inyectados o administración oral se indujeron daños además de en el hígado, en riñones, pulmones, timo y corazón (Sivonen y Jones 1999), Estos daños en múltiples órganos hicieron que esta toxina se considere en la actualidad citotoxina. La DL_{50} disminuye de manera muy importante con el tiempo después de una única inyección, así después de 24 horas es de $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$, disminuyendo a una décima parte de este valor pasados de 5 a 6 días. No existen datos concluyentes acerca de cual es la principal causa bioquímica responsable de la toxicidad, pero esta disminución en la DL_{50} a los 5 días parece indicar un modo lento de actuación. Los estudios realizados indican dos mecanismos fundamentales (Falconer y Humpage 2006).

El primero de ellos es el efecto que este compuesto produce en las enzimas responsables de la síntesis de proteínas. De hecho uno de los primeros efectos que se producen tras la inyección de cilindropermopsina es que los ribosomas del hígado se disocian del retículo endoplásmico rugoso. Esta inhibición de la síntesis fue confirmada posteriormente por medio del ensayo de la síntesis de la globina utilizando un sistema de reticulocito de conejo libre de células (Froscio y col., 2001). La entrada en las células es rápida, en una hora en sistemas “in vitro” con células de reticulocito se produce la inhibición. Bioquímicamente la inhibición ocurre en el ribosoma a nivel de la elongación de la cadena peptídica (Froscio y col., 2001).



El segundo gran efecto es la toxicidad que presentan los compuestos oxidados de la cilindrospermopsina, esta oxidación es dependiente del citocromo P450, aunque esta no parece la ruta principal de toxicidad, que parece ser explicada de mejor manera por medio de la inhibición de la síntesis proteica (Falconer y Humpage 2001).

Otros efectos secundarios de esta toxina en las células son la reducción de la cantidad de GSH lo cual ocurría en cualquier efecto tóxico, por ejemplo en el caso de la toxicosis debida a la microcistina LR, y que no implica un incremento en el estrés oxidativo por lo que no sería importante en la toxicidad (Falconer y Humpage 2001). Respecto al posible efecto carcinogénico de esta toxina, el hecho de que presente un potencial grupo guanidina y grupos sulfatos sugieren que la esta toxina también podría tener efectos directos sobre el ADN o ARN. Esta posible interacción se ha confirmando encontrando que un tratamiento con cilindrospermopsina produce unión covalente al ADN del compuesto, acompañado de roturas en la doble cadena de ADN (Humpage y col., 2000). Para que se produzca esta genotoxicidad parece ser necesaria la modificación de la cilindrospermopsina por parte del citocromo P450 (Humpage y col., 2005). Esto datos parecen apoyar el carácter carcinogénico de esta toxina.

1.4. Cilindrospermopsina en el ecosistema.

Los datos acerca del efecto que tiene esta toxina sobre otros organismos que pueden coexistir con su presencia son muy escasos. De hecho los datos existentes sobre el efecto de esta toxina o de organismos productores es menor que los existentes para la anatoxina (Capítulo V). Hasta la fecha sólo se conoce como se comportan dos organismos acuáticos ante la presencia de organismos productores de cilindrospermopsina, por ejemplo el ciliado *Paramecium cf. caudatum* (Fabbro y col., 2001) y *Daphnia magna* ((Nogueira y col., 2006; Nogueira y col., 2004)). Mientras que el primero fue capaz de alimentarse de un organismo productor de cilindrospermopsina, el segundo fue sensible a una cepa de *C. raciborskii* productor de cilindrospermopsina. La falta de datos impide hacerse una idea de cual es el efecto que este tipo de toxinas tiene en el ecosistema. Aunque esta toxina se ha mostrado que puede persistir en el



ecosistema sin degradarse durante periodos elevados de tiempo, alcanzando valores elevados de concentración al acumularse la toxina producida por los organismos al no degradarse (2006).

Una característica que diferencia a esta toxina del resto de las toxinas definidas en este trabajo anatoxina y microcistina, es que no puede considerarse una endotoxina, puesto que es altamente soluble y puede encontrarse tanto en el interior celular como en el medio en el que viven las células [Norris, Eaglesham, y col., 2001 #900], aunque no se conocen datos de cual es el porcentaje de la toxina que se encuentra en el interior celular, y cual es la proporción de ella que se encuentra en el medio extracelular.

1.5. Legislación.

Hasta el momento, como en el caso de las anatoxinas la Organización Mundial de la Salud no ha publicado ningún valor guía acerca de la cilindrospermopsina, ni para ninguna de sus variantes químicas. Sin embargo, [Humpage & Falconer 2003 #640] han propuesto un valor guía igual al que existe para la microcistina de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Humpage y Falconer 2003). Hasta el momento solo en una legislación nacional nombra esta toxina, esta es, como en el caso de anatoxina, Nueva Zelanda que establece un límite provisional para la cilindrospermopsina igual al valor guía propuesto (Kouzminov 2005)., En la legislación del estado de Queensland (Australia), donde su servicio de salud obliga a la determinación de esta toxina cuando la concentración de *Aph. ovalisporum* es superior a $15000 \text{ cel mL}^{-1}$, y Brasil recomienda que esta toxina no supere los $15 \mu\text{g L}^{-1}$, aunque no es de carácter obligatorio (Chorus 2005). El resto de los países entre ellos España carece de legislación al respecto.

Los datos de parámetros físico-químicos, de nutrientes, especies algales presentes cianobacterias y concentraciones de clorofila, así como algunos de los muestreos realizados en este embalse fueron realizados por miembros del CEDEX.



2. Objetivos

Dado la falta de datos acerca de la presencia de cilindropermopsina y sus productores en España y en Europa, los objetivos de este capítulo son:

- ⇒ Analizar la población de cianobacterias en el embalse estudiado e identificar posibles productores de cilindropermopsina.
- ⇒ Analizar por medio de bioensayos con *Artemia salina* las muestras con el fin de detectar posibles episodios tóxicos.
- ⇒ Analizar por medio de HPLC las muestras sestónicas con el fin de detectar la presencia de cilindropermopsina.
- ⇒ Determinar la proporción de cilindropermopsina intra y extracelular que presenta un cultivo de *Aph. ovalisporum*, y como le afectan los factores ambientales.



3. Materiales y Métodos.

3.1. Zona de Estudio.

La zona de estudio incluye el embalse de Arcos descrito ya en el capítulo IV.

3.2. Toma de muestras.

La toma de muestras fue realizada como se ha descrito en el capítulo IV .

3.3. Determinación de parámetros químicos.

El análisis de las características químicas fue realizada “in situ” mediante un laboratorio portátil Lange (Germany). Se analizaron las siguientes variables: amonio, que fue analizado utilizando el método Spectroquant 14752 que se basa en el método del azul 2,2-isopropil 5,5-metil-indofenol blue; Nitrato que fue determinado por medio del método Spectroquant 14773 basado en la reacción del nitrato en presencia de sulfúrico con el nitrospectral; Nitritos, Spectroquant 1477 basado en el método del ácido sulfanílico y del N-(1-naftyl) etilen-diamonio; Fósforo reactivo soluble que fue medido por el método del ácido ascórbico.

3.4. Determinación de parámetros químicos.

Los parámetros físico-químicos, temperatura, conductividad, oxígeno disuelto, turbidez y pH, fueron medidos “in situ” por medio de una sonda multiparamétrica YSI modelo 6920 (EEUU) calibrada con anterioridad: la sonda se sumergió permitiendo que los sensores de oxígeno disuelto y pH se estabilizaran antes de comenzar la toma de datos, el descenso en la columna de agua se realizó despacio para obtener un mayor número de datos de la columna de agua, ya que la sonda toma un dato cada 4 s.



3.5. Análisis biológicos.

La concentración de clorofila *a* fue calculada a partir de las partículas retenidas en filtros GF/F utilizando la formula de Parsons y Strickland 1963, extrayendo los pigmentos con 90% acetona-agua a 4°C durante 24 h. El análisis de las especies de cianobacterianas presentes fue realizado como se ha descrito en el Capítulo IV.

3.6. Ensayo de toxicidad.

La toxicidad de las muestras fue realizada por medio de un bioensayo con *Artemia salina* ((Campbell y col., 1994) y (Metcalf y col., 2002)). El bioensayo fue realizado con nauplios obtenidos después de exponer quistes de comerciales (Marinemix, Wimex. Alemania) durante 48 h en agua marina artificial. El bioensayo fue realizado en plagas multipocillos de 90 añadiendo a cada pocillo 10 nauplios a cada pocillo y completando el volumen hasta 300 µL. Extractos metanólicos de filtros fueron obtenidos igual que para el análisis de microcistinas (capítulo II), pero después de la evaporación del extracto en el Girovap fue resuspendido en 1250 µL de agua marina artificial. Después de 24 y 48 h de exposición a los extractos, las *Artemia* se observaron bajo lupa binocular (Leica MZ7.5m, Reino Unido) y los nauplios inmóviles fueron considerados muertos y se anotó su número. Después de contar los muertos a 48 h, se añadieron 100 µL de formaldehído a cada pocillo y se confirmó el número total de nauplios en cada pocillo. De esos datos se obtuvo una grafica de dosis/mortalidad, que se ajustó a una función sigmoidea y con ella se calculó la LC₅₀ como µg de clorofila *a* necesarios para matar al 50% de los nauplios. Otro parámetro de toxicidad, el VL₅₀ fue definido como el volumen de agua que contiene las partículas (células) necesaria para matar al 50% de los individuos del bioensayo.

3.7. Extracción y análisis de cilindrospermopsina.

Las muestras para el análisis de cilindrospermopsina fueron conservadas a 4 °C hasta que se filtraron a través de filtros GF/F (Whatman, Gran Bretaña) de 47 mm de



diámetro, con un valor nominal de tamaño de partícula retenida de 0,7 μm . Para la filtración se utilizó una rampa de filtración de aluminio (Pall corp., Estados Unidos) y una bomba de vacío Me 4P (Vacuubrand GMBH, Alemania), a baja presión, con el fin de evitar la rotura celular. El volumen de filtración fue de 300 a 1000 mL en función de la biomasa presente. Las muestras filtradas se mantuvieron en nieve carbónica (-50 °C) hasta su llegada al laboratorio, momento en que se guardaron a -20 °C.

Para la extracción de cilindropermopsina, el filtro fue introducido en un tubo de centrifuga, al que se añadieron 2 mL de solución salina (0,9% NaCl) con 2% de ácido fórmico (Grado analítico, Merck), esta mezcla fue sometida a ultrasonificación mediante un sonicador de pistón VibraSonic en su rango de energía media, se le dieron tres pulsos de 30 s manteniendo la muestra a 4°C. Posteriormente fue centrifugada a 5000 rpm y se retiró el sobrenadante. El sobrenadante fue finalmente pasado a través de un filtro de peso molecular (10 KDa, Micro VectaSpin, Whatman. Reino Unido) mediante centrifugación. El contenido en cilindropermopsina en dicho sobrenadante fue analizado por HPLC.

El análisis de las muestras para detectar la presencia de anatoxina fue realizado con un HPLC modelo 2695 “Alliance”, con un inyector automático y un detector con un conjunto de diodos modelo 996 (Waters, Estados Unidos). Para la separación cromatográfica se utilizó el gradiente descrito por (Torokne y col., 2004). Brevemente se utilizó una carrera isocrática utilizando como fase móvil 5% metanol-agua (milliQ) utilizando como modificador 0.05% TBAHS tetrabutilamonio sulfato concentrado (Fluka, Alemania). La columna utilizada fue una Spherisorb S5 ODS2 (4.6 x 250 mm) (Waters, Reino Unido). La cilindropermopsina se identificó por su espectro de absorción en UV y su tiempo de retención comparándolo con el patrón de cilindropermopsina purificada y cuantificada por el Prof. S. Carmeli (Universidad de TelAviv, Israel) como fue descrito en (Banker y col., 1997). La concentración fue calculada relacionando el área obtenida a 264 nm con la cantidad inyectada del patrón (Figura V.3 y Figura V.4).

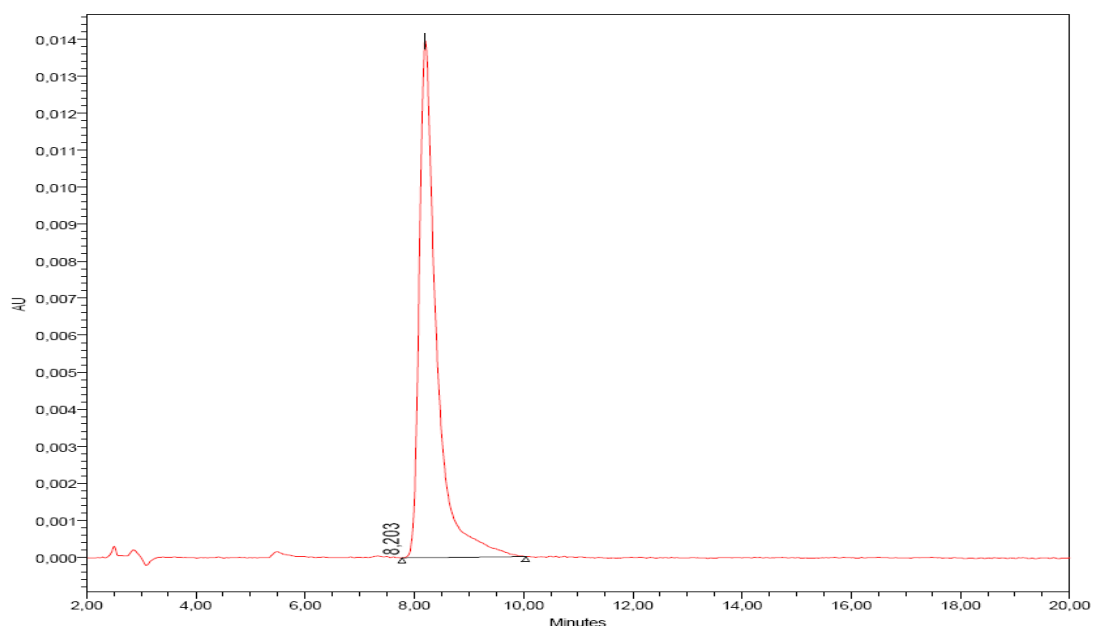


Figura V.3. Ejemplo de inyección de patrones de cilindropermopsina.

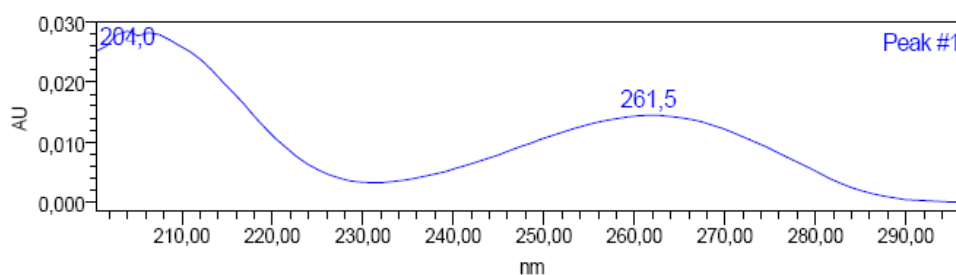


Figura V.4. Espectro de absorción característico de la cilindropermopsina.

3.8. Relación entre cilindropermopsina intracelular y extracelular y como afectan los factores ambientales.

Una cepa de *Aph. ovalisporum* aislada del lago Kinneret se creció en medio BG11 tamponado con HEPES (25 mM) hasta alcanzar la fase estacionaria, momento en que fue recogida por centrifugación (Sorvall RC-5C, Francia) utilizando un tubo DRY-SPIN de sorvall de polipropileno de 500 ml en un rotor GS3 a 7000 rpm, a temperatura ambiente, lavando en tres ocasiones y resuspendido finalmente en BG11 sin tamponar. De este cultivo se tomaron 3 alícuotas que se pusieron en medio BG11 (Hepes 25 mM,



pH = 7, Temp. = 25 °C, Luz = 22 μ E) condiciones control, que eran las mismas en las que se encontraba la cepa creciendo antes de recuperarla. Luego se pusieron 2 alícuotas, para el resto de los casos analizados (Tabla V.1), estos cultivos se analizaron a tiempo 0 h, 24 h, 48h y 72 h. A cada uno de estos tiempos se tomaron dos muestras de 35 mL que se filtraron a través de filtros pre-tarados de polycarbonato de 1 μ m de tamaño de poro (Osmonic INC., EEUU). Posteriormente se congelaron a -80°C, se liofilizaron y se pesaron antes de extraer y analizar las toxinas presentes como ha sido descrito en el apartado anterior, y se utilizaron para calcular la toxina intracelular. Además se tomaron 50 mL que se congelaron a -80 °C y se liofilizaron, la biomasa recuperada fue resuspendida en 2 mL de solución salina (0,9% NaCl) con 2% de ácido fórmico (Grado analítico, Merck), y la toxina presente se extrajo y analizó en las mismas condiciones utilizadas en el apartado anterior.

Caso	pH (tampon mM)	Temperatura (°C)	Luz (μ E)
Control	7 (Hepes 25 mM)	25	22
pH 5,5	5,5 (MES 25 mM)	25	22
pH 8,5	8,5 (Tris-ClH 25 mM)	25	22
15°C	7 (Hepes 25 mM)	15	22
20°C	7 (Hepes 25 mM)	20	22
30°C	7 (Hepes 25 mM)	30	22
Alta luz	7 (Hepes 25 mM)	25	115

Tabla V.1: Condiciones ambientales utilizadas.



4. Resultados.

El embalse de Arcos se sitúa en el extremo sur de la Península Ibérica. Este embalse se caracteriza por presentar aguas con una elevada conductividad, y por ser el primero en el cual se ha detectado en grandes cantidades el potencial productor de cilindrospermopsina *Aph. ovalisporum*, un organismo que parece haber empezado a tener una importancia creciente en la zona mediterránea.

4.1. Características Ambientales.

El embalse de Arcos fue muestreado en 7 ocasiones a lo largo del año 2004. Las muestras fueron tomadas a la profundidad a la que se determinó la máxima concentración de clorofila mediante sonda fluorométrica. Las características ambientales encontradas en ese punto se resumen en la Tabla V.2. La concentración de clorofila *a* se encontró en un rango entre 4,5 y 52,3 $\mu\text{g l}^{-1}$, obteniéndose los valores mas elevados entre finales del mes de agosto y finales del mes de septiembre, lo que parece indicar que las altas concentraciones clorofila podrían haberse mantenido a lo largo de todo el mes. El agua muestra valores elevados de conductividad, por encima de 1200 $\mu\text{S cm}^{-1}$, alcanzado valores superiores a 1700 $\mu\text{S cm}^{-1}$ en le mes de julio. El pH puede considerarse alcalino encontrándose valores entre 7,5 y 8,3. La temperatura del agua fue alta con valores máximos superiores a 27 °C y durante la mayor parte del año la temperatura fue superior a 25 °C. El oxígeno disuelto se encontró entre el 80% y el 105% de saturación. Finalmente las concentraciones de nutrientes, presentan importantes diferencias cuando comparamos los valores de nitrógeno inorgánico soluble (NID) y el fósforo reactivo soluble. El NID presentó concentraciones elevadas con valores superiores a 1 mg L^{-1} . Mientras que el fosfato, salvo en el mes de mayo, estuvo siempre por debajo del limite de detección. Cabe destacar los cambios en temperatura y en conductividad que ocurrieron entre el 21 de julio y el 19 de agosto, entre los cuales la temperatura bajó dos grados y la conductividad casi 500 $\mu\text{S cm}^{-1}$, lo que podría indicar una entrada de agua hipolimnetica desde el embalse de Bornos situado aguas arriba del embalse analizado.



Día de muestreo	Clo <i>a</i> μg l ⁻¹	pH	Cond. μS cm ⁻¹	Temp. °C	O ₂ Dis. mg/l (%sat)	N-NH ₄ ⁺ μg l ⁻¹	N- (NO ₃ ⁻ +NO ₂ ⁻) μg l ⁻¹	P-PO ₄ ³⁻ μg l ⁻¹
19/05/2004	5.3	7.5	1460	19.9	9.9 (105)	24	1277	30
22/06/2004	4.5	8.0	1473	25.9	6.7 (80)	20	493	<10
21/07/2004	22.7	8.0	1756	27.2	8.0 (100)	94	502	<10
10/08/2004	14.2	8.0	1277	25.6	8.2 (95)	69	166	<10
24/08/2004	52.3	7.7	1312	25.9	8.8 (105)	70	224	<10
21/09/2004	28.8					99	100	<10
07/10/2004	14.0	8.3	1586	24.3	6.2 (80)	44	113	<10

Tabla V.2: Características ambientales del embalse de Arcos.

4.2. Estructura de la comunidad fitoplanctónica.

El fitoplancton en el embalse muestra una marcada sucesión ecológica durante el periodo de estudio. Las cianobacterias solo llegan a ser relevantes en la población a partir de mediados de julio (Figura V.5). Con anterioridad la comunidad estuvo dominada por dinoflagelados (*Ceratium furcoides*) y por algas verdes (*Closterium aciculare*). Los dinoflagelados estuvieron presentes en la población fitoplanctónica durante todo el periodo de muestreo, pero disminuyeron cuando las cianobacterias pasaron a dominar la comunidad. Otros grupos no representados en la Figura V.5 y que si estuvieron presentes en el embalse fueron Rafidofitas, Crisofitas, Xantofitas y Euglenofitas, pero en ningún caso su biovolumen superó los 140 mm³ m⁻³ y representaron como máximo el 3,3% del biovolumen total, con la excepción de *Vacuolaria sp.* (Rafidiofitas) que dominó la población en mayo aún apareciendo a muy bajas concentraciones. Cuando analizamos las especies de cianobacterias que estuvieron presentes durante el periodo analizado, encontramos 8 géneros diferentes, de éstos, 4 tuvieron una importancia marginal en la población: *Pseudanabaena sp.*, *Synechococcus sp.*, *Woronichinia naegeliana* y *Microcystis aeruginosa* que nunca alcanzaron valores superiores a las 600 cel. mL⁻¹, y solo representaron un máximo del 0.57% del biovolumen cianobacteriano total (datos no mostrados). Las otras cuatro especies que si



mostraron abundancias relevantes en la población fueron: *Aphanizomenon ovalisporum*, *Aphanocapsa* sp., *Merismopedia* sp. y *Planktothrix cf. agardhii* (Figura V.6).

Planktothrix cf. agardhii fue la cianobacteria dominante en el mes de julio, alcanzando el 95.3% de la biomasa cinoabacteriana expresada como biovolumen, si bien en el resto de los momentos en los que las cianobacterias fueron importantes en la población esta especie fue subdominante. Su lugar como especie cianobacteriana más importante fue ocupada a partir de entonces por *Aphanizomenon ovalisporum* que dominó la población hasta el mes de septiembre, alcanzando valores de $2709 \text{ mm}^3 \text{ m}^{-3}$. En mes de octubre las cianobacterias dejaron de ser importantes en el biovolumen total y la comunidad volvió a ser dominada por los dinoflagelados.

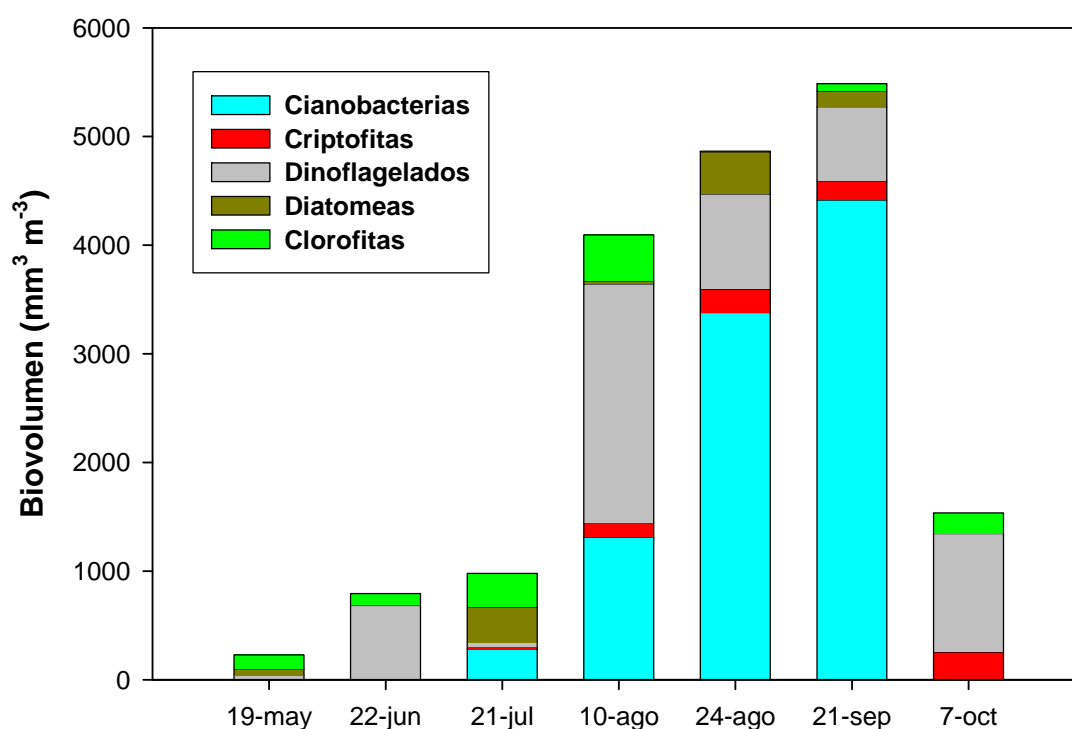


Figura V.5: Biovolumen de los grupos algales principales en el embalse de Arcos.

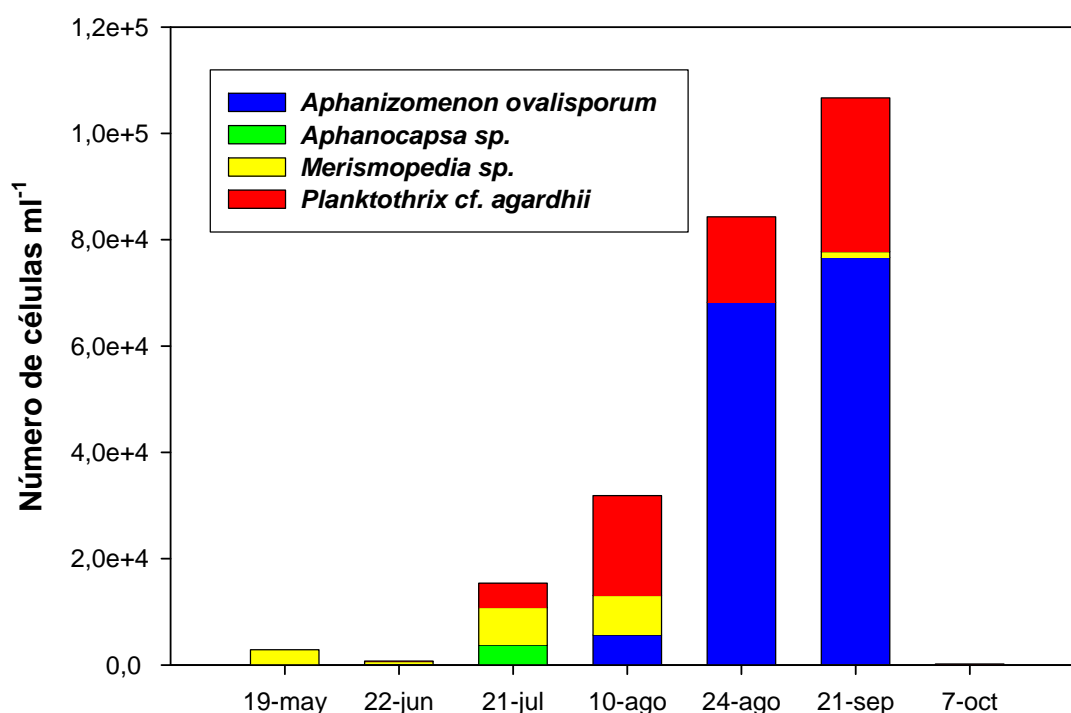


Figura V.6: Número de células de las cuatro especies cianobacterianas dominantes en el embalse de Arcos.

4.3. Toxicidad de las muestras.

Los resultados obtenidos en este embalse muestran que el 43% de las muestras analizadas fueron tóxicas en el bioensayo utilizado (Figura V.7), aunque una de ellas fue menos tóxica de lo que se necesitaría para calcular la LC_{50} bajo nuestras condiciones de análisis. A esta muestra con el objetivo de visualizar la presencia de esa toxicidad se le ha asignado un valor de toxicidad 10 veces inferior a la menor toxicidad encontrada en este trabajo. En el resto de los casos los valores de toxicidad fueron similares, situando los valores de LC_{50} entre 2.8 y 3.4 $\mu\text{g Clo } a \text{ mL}^{-1}$. Cuando estos valores fueron expresados como VL_{50} observamos que era necesario filtrar 220 mL y 340 mL



respectivamente en agosto y septiembre para conseguir matar al 50% de los nauplios de *Artemia* del bioensayo. Esto nos permite obtener un valor de toxicidad en volumen de agua del embalse lo que puede resultar muy útil para la gestión del recurso. La toxicidad y las concentraciones de cilindrospermopsina estuvieron correlacionadas con el biovolumen del principal posible productor de este compuesto en el embalse *Aph. ovalisporum*, y no directamente relacionados con la abundancia de *P. agardhii* la otra cianobacteria presente potencialmente tóxica.

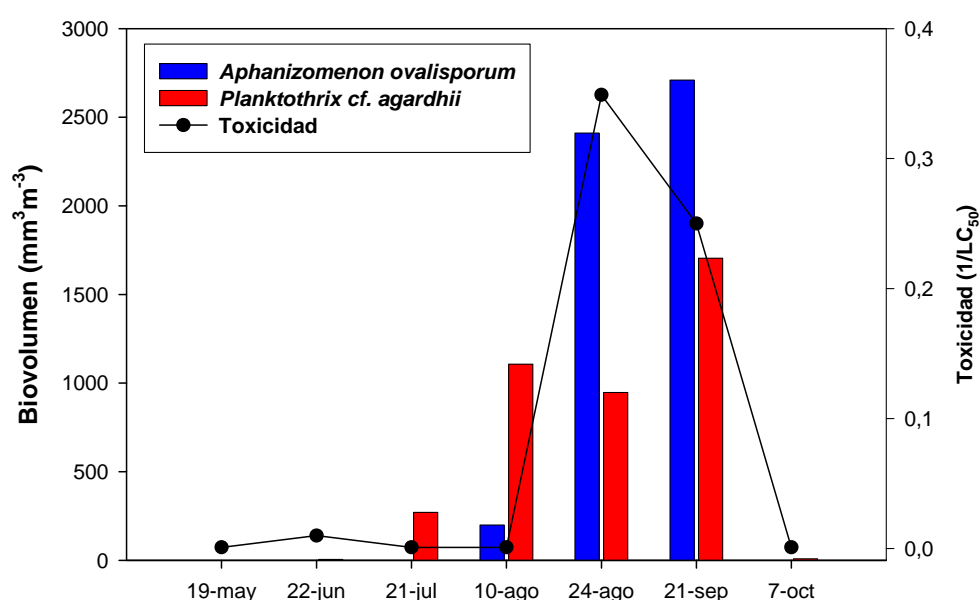


Figura V.7: Toxicidad y biovolumen de las dos especies potencialmente tóxicas mayoritarias en el embalse de Arcos.

4.4. Concentraciones de cilindrospermopsina.

La única cianotoxina que ha sido posible detectar en el embalse de Arcos fue la cilindrospermopsina, aunque también se analizó la presencia tanto de anatoxina, como microcistina. La presencia de las otras dos toxinas analizadas, si es que estuvieron presentes, debió encontrarse por debajo del nivel necesario para poder ser detectadas por



medio del bioensayo utilizado. Las concentraciones de cilindropermopsina detectadas alcanzaron valores de $9,4 \mu\text{g L}^{-1}$, estando en ocasiones por debajo del límite de detección. La concentración total pudo ser mayor debido a que esta toxina puede encontrarse en la fracción disuelta y esta fue analizada en una sola ocasión encontrándose el día 24 de agosto una concentración de cilindropermopsina de 3,17 (L. Wörmer, comunicación personal). Si asumimos que esta toxina fue únicamente producida por *Aph. ovalisporum*, la concentración en términos de biomasa presentaría una media de $0.16 \text{ pg CYN cel}^{-1}$, $4.7 \mu\text{g CYN mm}^{-3}$ o $5.5 \text{ pg CYN por filamento}$.

4.5. Relación entre cilindropermopsina intracelular y extracelular y como afectan los factores ambientales .

Con el fin de determinar cual era la capacidad que poseía esta toxina para atravesar la membrana y cual era su dinámica procedimos a realizar un experimento de laboratorio con una cepa del mismo organismo *Aph. ovalisporum* aislada del lago Kinneret (Israel). Se determinó el crecimiento y la producción de cilindropermopsina bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y luz.

Cuando analizamos como varió el peso seco (Figura V.8), observamos que el caso del tratamiento $\text{pH} = 8,5$, el resto de los tratamientos no existen diferencias importantes entre los diferentes tratamientos, aunque el $\text{pH} = 5,5$ parece que tuvo una carga de biomasa inferior al resto de tratamientos, la curva mantuvo un comportamiento similar. En cuanto a como se comportó la relación entre el peso seco y la concentración total de cilindropermopsina (intra y extracelular) (Figura V.10), podemos observar que como en el caso del peso seco, solo en el tratamiento $\text{pH} = 8,5$ se comportó de manera diferente especialmente coincidiendo con la bajada en el peso seco del cultivo. En el resto de los casos la relación se mantuvo constante a lo largo del tiempo (salvo una



pequeña subida no significativa en el caso de control a las 72 horas) lo que indicaría que el cambio de medio, no modificó la producción de cilindrospermopsina.

Cuando analizamos como se comportó la relación de cilindrospermopsina (Figura V.10) entre la fracción extracelular e intracelular vemos que en las condiciones control, que eran las condiciones en la que el organismo había sido crecido desde su aislamiento, la concentración de cilindrospermopsina se repartió en partes iguales entre la fracción extracelular e intracelular al cabo de 48 horas (50% extracelular y 50% intracelular) manteniéndose estable hasta la 72 horas, siguiendo una curva de saturación típica. Cuando analizamos como los diferentes factores afectaban a este porcentaje observamos que la temperatura no afecta a la relación de toxina intra y extracelular, observamos que el comportamiento es muy similar al encontrado en el tratamiento control, la única diferencia apreciable consistía en un ligero retraso del cultivo crecido a 15 °C, que no alcanzó el 50% de la toxina extracelular hasta las 72 horas. Los otros dos factores el pH y la luz, sin embargo si presentaron un efecto sobre la cantidad de toxina que encontramos en el medio. El pH aumenta la cantidad de toxina extracelular, siendo esta mucho más evidente en el caso del pH = 8,5, donde después de 72 horas toda la toxina encontrada era extracelular, aunque en este caso esto se debió a la toxicidad que presento el tampón utilizado y que produjo la lisis del cultivo, lo que puede observarse al ver que el peso seco (Figura V.9), en ella podemos observar que en este caso se produce una brusca caída en el peso seco ya a las 24 horas cayendo a la mitad. Cuando analizamos el resto de los casos podemos observar que casi no hubo crecimiento a lo largo del tiempo. Se observa un efecto lineal a lo largo del tiempo, alcanzando un valor extracelular de aproximadamente el 80% de la toxina en el medio. Cuando ponemos el cultivo en alta luz, lo que podemos observar es que desde la primera medida a 24 horas la concentración extracelular es ligeramente mas elevada que en el tratamiento control, y que se mantiene así a lo largo de todo el experimento sin que parezca entrar en la fase de saturación, para alcanzar un valor cercano al 80%, como en el caso del pH = 5.



Resultados

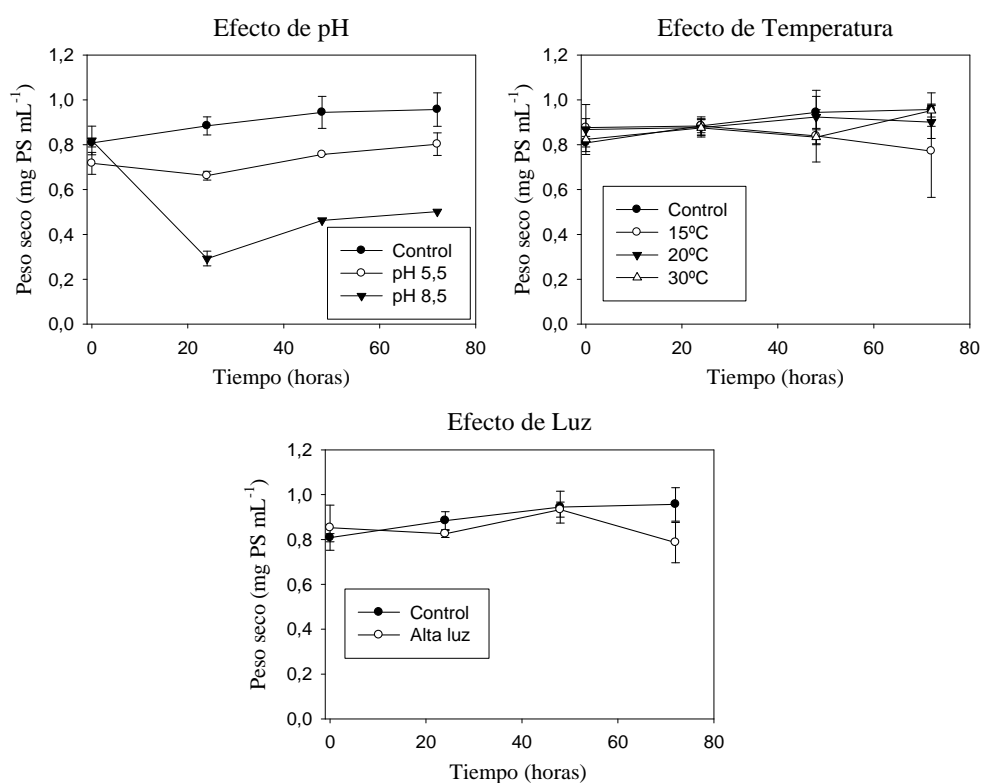


Figura V.8: Efecto del pH, temperatura y luz sobre le el peso seco.

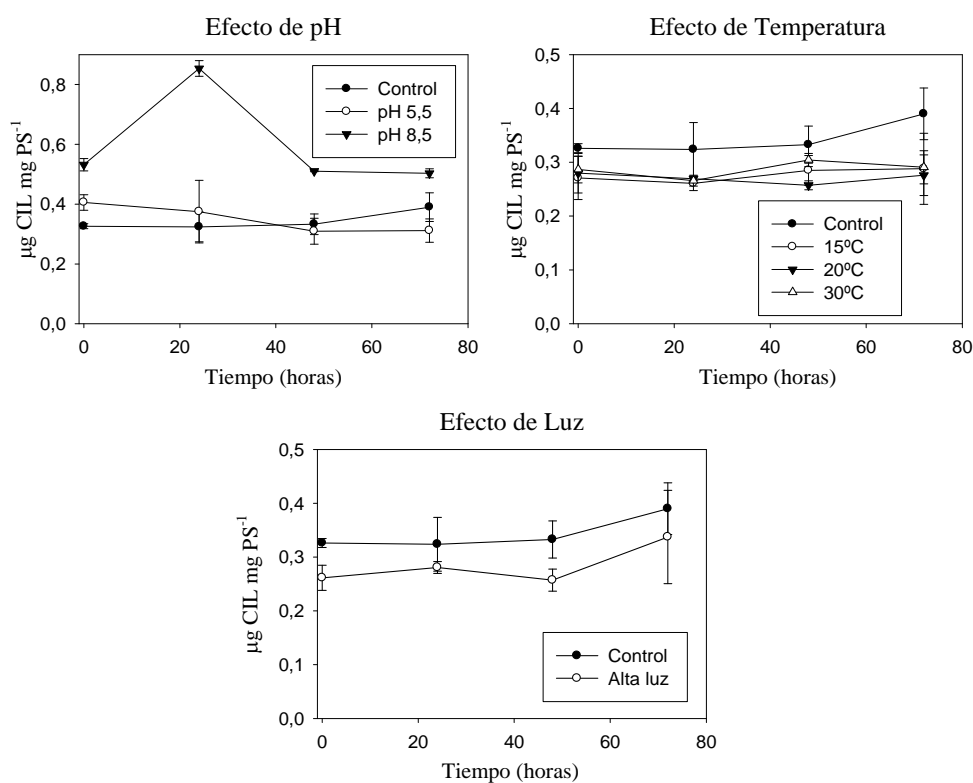


Figura V.9: Efecto del pH, temperatura y luz sobre le relación µg CIL total mg PS.

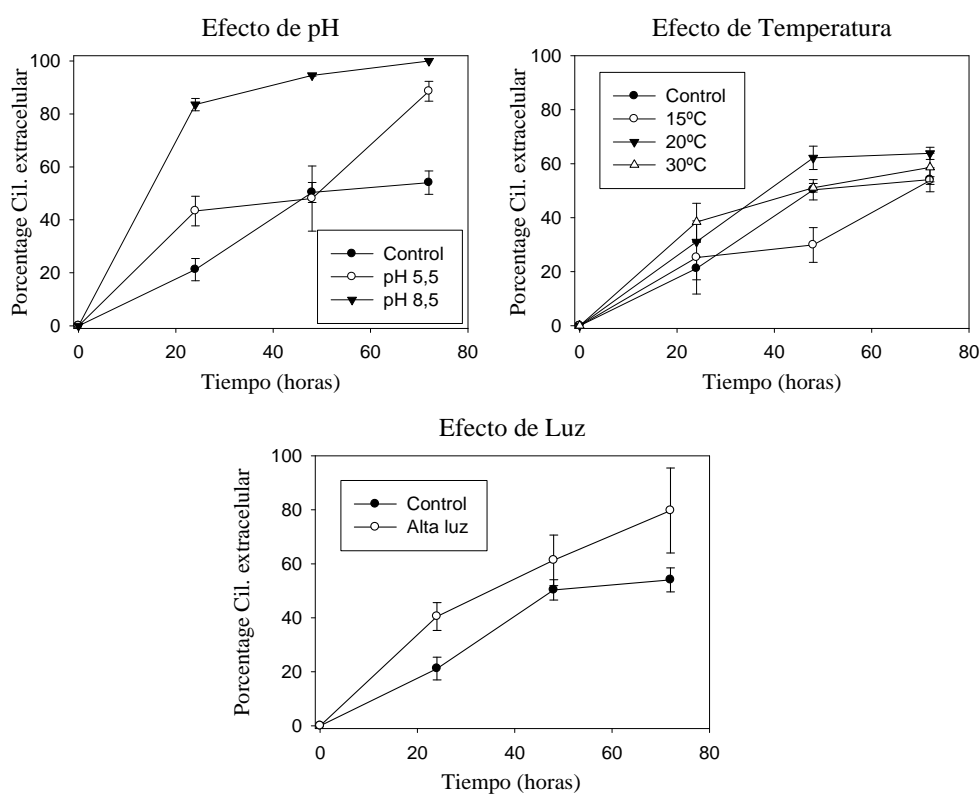


Figura V.10: Efecto del pH, temperatura y luz sobre le porcentaje de cilindrospermopsina extracelular sobre la microcistina total.



5. Discusión

Durante los últimos años ha existido un creciente interés en la presencia de cilindrospermopsina en los cuerpos de agua europeos, especialmente debido a la que durante estos años se ha tenido constancia de la mayor importancia que va teniendo uno de sus productores principales en nuestros cuerpos de nuestro continente *C. raciborskii* (Briand y col., 2004), aunque como veremos con posterioridad las cepas de esta especie encontrados en nuestro continente parecen no ser capaces de producir esta toxina. Menor importancia se ha dado a otros posibles productores, especialmente a *Aph. ovalisporum* puesto que hasta hace poco se consideraba una especie rara, y no se conocía la aparición de afloramientos de esta especie en Europa.

Los resultados que se muestran en este capítulo suponen el primer afloramiento de *Aph. ovalisporum* en un cuerpo de agua dulce Europeo, aunque la especie se ha encontrado en Grecia, Italia y Turquía ((Gkelis y col., 2005) (Kouzminov 2005) y (Cirik y col., 1992)). La dominancia de esta especie de cianobacterias en el mes de agosto del 2004 parece estar asociada con una entrada de agua fría hipolimnética desde el embalse de Bornos situado aguas arriba. Nosotros especulamos que esta agua pudo traer el inóculo inicial de esta especie en forma de acinetos, aunque sería necesario un estudio más en profundidad para poder confirmar esto. Esta entrada de agua contribuyó a disminuir a un tercio las formas oxidadas de nitrógeno inorgánico (nitrato y nitrito). Esta deficiencia de nitrógeno podría haber disparado la sucesión ecológica favoreciendo a una especie fijadora de nitrógeno como puede ser *Aph. ovalisporum*.

Aph. ovalisporum es una conocida cianobacteria que empezó a atraer una especial atención cuando fue descrita en 1994 como una especie invasora, que fue capaz de producir afloramientos en el lago Kinneret, la principal fuente de agua potable de Israel (Zohary 2004), siendo descrita poco después como especie productora de cilindrospermopsina (Banker y col., 1997). Esta especie ha sido encontrada también en varios embalses de nueva construcción en Australia (Shaw y col., 1999). Aparte de en estas localizaciones, esta especie solo ha sido descrita en Europa, en Grecia (Gkelis y



col., 2005) y en Italia (Bazzichelli y Abdelahad 1994), aunque su presencia en América parece confirmada (Komarek 1984).

El afloramiento de *Aph. ovalisporum* del embalse de Arcos alcanzó sus concentraciones máximas entre los meses de agosto y septiembre, con una concentración máxima de 3834 filamentos mL⁻¹, cuando la temperatura del agua fue superior a 25 °C y la conductividad se encontró en valores alrededor de 1500 µS cm⁻¹. Estas condiciones fueron similares a las encontradas en el lago Kinneret y en los embalses donde se encontró en Australia ((Hadas y col., 2002; Pollingher y col., 1998) y (Shaw y col., 1999)). Mientras que la población de *Aphanizomenon* fue similar a la encontrada en el lago Kinneret, con un máximo de varios millares de filamentos por mL, en los embalses australianos fue bastante superior llegando a formar un gran acumulo superficial. Esta diferencia puede deberse a una menor carga de nutrientes, o a las diferentes condiciones meteorológicas o hidrológicas (Walsby y col., 2003).

Tras la aparición del afloramiento de *Aph. ovalisporum* en el lago Kinneret, (Banker y col., 1997) consiguieron aislar la toxina cilindrospermopsina de cultivos de laboratorio obtenidos de las muestras del lago. Como es habitual entre los productores de cianotoxinas, la producción no depende de la especie encontrada sino de la cepa concreta, por ejemplo en Portugal y Alemania se han aislado varias cepas de *C. raciborskii*, especie que es conocida por su capacidad de producir cilindrospermopsina en Australia y América, que se han caracterizado por presentar toxicidad pero no debida a la cilindrospermopsina ((Saker y col., 2003) y (Fastner y col., 2003)).

En los últimos años se han utilizado varios ensayos de toxicidad con diversos organismos modelos que han mostrado el efecto de las cilindrospermopsina ((Nogueira y col., 2004; Kiss y col., 2002) y (Metcalf y col., 2002)). En este trabajo hemos utilizado un bioensayo con *Artemia salina* para identificar la toxicidad en afloramientos de cianobacterias. Este test muestra que las muestras de seston recogidas del embalse de Arcos a final de agosto y septiembre fueron tóxicas. Cuando analizamos esta toxicidad en función de que especie de cianobacteria esté presente observamos que esta toxicidad se correspondía mejor con la presencia de *Aph. ovalisporum* que con la presencia de *P.*



agardhii el cual llegó a presentar biomasa de 4590 células por mililitro el día 21 de julio, sin embargo la biomasa obtenida ese día no presentó efectos tóxicos en el bioensayo de *Artemia*.

Para asegurar que el efecto de toxicidad se debía a la cilindrospermopsina, se analizaron las muestras en busca de los otros dos tipos de cianotoxinas más habituales: microcistinas y anatoxinas. Sin embargo, ninguna toxina de estos tipos pudo ser encontrada. Estos son los primeros datos de concentraciones elevadas de cilindrospermopsina en cuerpos de agua europeos. Dicha toxina ha sido también encontrada en Alemania ((Fastner y col., 2007) y (Fastner y col., 2003)), en este país las concentraciones más elevadas detectadas fueron de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$, aunque la metodología utilizada impidió conocer las concentraciones de cilindrospermopsina en $\mu\text{g L}^{-1}$, aunque comparando los datos de cilindrospermopsina (CIL) en $\mu\text{g CIL } \mu\text{g PS}^{-1}$, parecen indicar que las concentraciones encontradas estuvieron en el mismo rango en ambos trabajos, lo que indicaría que estos estuvieron por debajo de los encontrados en el embalse de Arcos cerca de 2 órdenes de magnitud. Las concentraciones de cilindrospermopsina encontradas en nuestro trabajo son similares a las encontradas en el lago Kinneret, donde el contenido de cilindrospermopsina por peso seco estuvo en un rango entre 1 y $3 \mu\text{g mg PS}^{-1}$ (A. Sukenik comunicación personal) de peso seco, dos órdenes de magnitud superiores a los encontrados en Alemania. Sin embargo estos datos fueron muy inferiores a los publicados en Australia [(Shaw y col., 1999).

El análisis de cilindrospermopsina fue realizado sobre filtros, este hecho impide conocer cual era la concentración de cilindrospermopsina total, puesto que esta toxina es capaz de atravesar la membrana plasmática y encontrarse tanto en el interior celular como en el medio que las rodea (Norris y col., 2001), aunque no existen datos publicados en revistas internacionales que indiquen cual es la importancia que esta fracción tiene sobre el total, datos encontrados por nuestro grupo de investigación (Wormer 2006) muestran que esta toxina puede presentarse en concentraciones similares en el medio que en la fracción datos que estarían de acuerdo con los valores obtenidos en el experimento realizado que muestra que, al menos en la cepa de cianobacteria utilizada el 50% de la toxina encontrada aparece en el medio extracelular, y que esta parece ser



capaz de atravesar la membrana. Los experimentos realizados con la cepa aislada del lago Kinneret muestran que en tan solo 72 horas la concentración de toxina extracelular parece alcanzar el equilibrio con la intracelular, encontrándonos la mitad de la toxina dentro de las células y la otra mitad en el medio que las rodea. En cuanto a los factores ambientales ensayados en los experimentos de laboratorio, parecen indicar que la temperatura no influye en la cantidad de toxina presente. sin embargo, pH e irradiancia si influyen. Esto puede deberse a que ambos producen lisis de las células, y de esta manera incrementan la cantidad de toxina extracelular. Por otro lado esta pérdida de toxina intracelular no parece que afecte a su producción a corto plazo, de manera que parece que al menos en 72 horas la pérdida de toxina intracelular no aumentó su producción. Estos valores de toxina extracelular convierten a esta cianotoxina en un compuesto que puede tener especial relevancia a la hora de considerar los cuerpos de agua con usos recreativos, ante la aparición de este tipo de toxinas. El que dicha toxina sea soluble y extracelular incrementaría su efecto sobre los organismos que entren en contacto con ella, en comparación por ejemplo a la microcistina que es una endotoxina y es necesaria la lisis celular para que pueda ponerse en contacto con los seres humanos, si no existe una ingestión accidental de biomasa que presente microcistinas.

Esta es la primera vez en que este compuesto, la cilindrospermopsina y el organismo productor, *Aph. ovalisporum* fue detectado en aguas españolas, aunque con posterioridad ha sido detectado en otros cuerpos de agua españoles (Wormer 2006). Esto, junto con la detección en más de la mitad de los cuerpos de agua analizados en Alemania (Fastner y col., 2007), parecen indicar que sería importante desarrollar un valor guía para este tipo de toxinas que no ha sido establecido en la legislación europea. En Australia y Nueva Zelanda donde la presencia de este tipo de organismos y de toxina esta regulado, aunque no existe en el caso del primero de ellos un valor guía en cuanto a su concentración ((Chorus 2005) y (Kouzminov 2005)). El efecto de la cilindrospermopsina sobre humanos cuando el contacto es por vía recreativa es desconocida, sin embargo el hecho de que una importante parte de la toxina pueda ser extracelular (Shaw y col., 1999) y su toxicidad podría hacer que su presencia en un cuerpo de agua representara una limitación de sus usos recreativos.



DISCUSIÓN



España como país que posee un clima Mediterráneo, presenta escasez de agua que puede considerarse crónica. Esta falta de agua a llevado a que seamos uno de los países europeos que presenta una mayor utilización de las aguas superficiales para usos de abastecimiento de la población. En parte debido al gran número de embalses de los que dispone, mas de mil embalses construidos. Esta gran dependencia que gran parte de la población española tiene del agua embalsada para su consumo, hace apropiado dedicar especial atención a su calidad general, y a la presencia de cianobacterias tóxicas y sus toxinas en particular.

Como ya hemos indicado con anterioridad se han analizado en total 14 embalses en varias cuencas hidrográficas españolas, y sólo uno de los cuerpos de agua analizados no ha presentado cianobacterias potencialmente tóxicas. Esto parece indicar que la presencia de organismos potencialmente tóxicos es común en España, lo que confirma los datos publicados recientemente y que ya mostraban que salvo en las cuencas del Júcar y el Segura, las cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas son comunes en nuestros embalses, llegando en múltiples ocasiones a dominar la población fitoplanctónica. De esta manera los afloramientos de cianobacterias potencialmente tóxicas puede llegar a ser un hecho bastante usual en nuestros embalses.

En cuanto cuales podrían ser en cuestión de probabilidad los géneros de cianobacterias potencialmente tóxicas más comunes en nuestro país, parece claro que los tres géneros mas comunes son *Microcystis*, *Aphanizomenon* y *Anabaena* tal y como en otras zonas Mediterráneas. Estos 3 géneros junto con *Planktothrix* son los las cuatro géneros mas comunes en todo el mundo. Esto indicaría que nos encontramos ante un fenómeno global y no exclusivo de una zona específica. En cuanto a las especies más comunes en nuestro país, habría posiblemente cuatro que sobresaldrían sobre el resto, que serían: *M. aeruginosa*, *M. flos-aquae*, *Aph. flos-aquae* y *A. flos-aquae* y que fueron no sólo las mas comunes en la Comunidad de Madrid, sino en toda España según los datos de nuestros estudios no recogidos en esta Tesis Doctoral.

Cuando unimos la presencia de toxinas a las especies que aparecen en los embalses españoles, parece claro que *M. aeruginosa* destaca sobre el resto en cuanto a



la posibilidad de presentar toxicidad. Si existe un tipo de toxina que destaca sobre el resto en cuanto a prevalencia, éste es el grupo de las microcistinas. Siendo precisamente *M. aeruginosa* la que está relacionada con esta toxicidad, aunque en este trabajo no hemos podido correlacionar la concentración de toxina con su abundancia relativa, y hemos encontrado que existe una capacidad de producción de toxinas muy diferente en las diferentes cepas de esta especie que se han encontrado en los embalses.

En cuanto a *Anabaena*, es la especie que presenta la mayor diversidad en cuanto a la capacidad de producir toxinas, se conocen cepas dentro de este género que son capaces de producir las principales toxinas de cianobacterias, hepatotoxinas, neurotoxinas y citotoxinas. Pero en el caso de los embalses españoles parece claro que existe un bajo número de cepas capaces de producir toxinas, solo en una ocasión se ha podido asociar la presencia de toxicidad a un organismo perteneciente a este género: la producción de anatoxina en el embalse de Rosarito, presentando concentraciones muy bajas, menores a las encontradas en otros países europeos.

Una consideración aparte merece el género *Aphanizomenon*, esta claro que su capacidad de producir neurotoxinas es muy bajo, y no se ha confirmado que sean capaces de producir hepatotoxinas, pero parece que pueden ser el principal productor de cilindrospermopsina en Europa, y la falta de datos acerca de esta capacidad se debe fundamentalmente a que hasta hace muy poco tiempo los trabajos acerca de esta toxina se habían centrado en su principal productor en Asia y Oceanía, *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Finalmente, indicar que se han detectado los tres tipos de toxinas más habituales en los embalses españoles, aunque las concentraciones de anatoxina-a pueden considerarse bajas. Las concentraciones de los otros dos compuestos sin embargo han mostrado concentraciones elevadas en el rango de $\mu\text{g L}^{-1}$, especialmente en el caso de la microcistinas donde hemos detectado concentraciones superiores a los $50 \mu\text{g Mc L}^{-1}$, lo que es un valor elevado considerando que hemos evitado la recogida de muestras en acumulaciones de cianobacterias



CONCLUSIONES



Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido obtener las siguientes conclusiones:

- ⇒ Las cianobacterias potencialmente tóxicas son muy comunes en la Comunidad de Madrid, siendo los géneros más importantes *Microcystis*, *Aphanizomenon* y *Anabaena*.
- ⇒ Los afloramientos producidos por estos organismos son comunes y llegan a alcanzar elevadas concentraciones de clorofila *a*, aunque la falta de una definición que defina lo que es afloramiento dificulta su comparación.
- ⇒ Los dos especies más comunes de cianobacterias potencialmente tóxicas *Aph. flos-aquae* y *M. aeruginosa* aparecen juntas, lo que indica que poseen similares características ecológicas.
- ⇒ Nuestros datos han permitido definir el nivel de afloramiento en la Comunidad de Madrid cuando la concentración de clorofila *a* supera los 50 µg de clorofila *a* por litro.
- ⇒ La microcistina es el tipo de cianotoxina más común en la Comunidad de Madrid, pudiéndose encontrar en todos los embalses analizados (7) y alcanzando concentraciones superiores a 50 µg Mc L⁻¹, en la columna de agua, evitando las acumulaciones superficiales. La principal especie responsable de su producción es *M. aeruginosa*.
- ⇒ Los meses de septiembre y octubre son los que presentan mayor probabilidad de encontrar microcistinas en los embalses de la Comunidad de Madrid. Este rango temporal coincide también con el que abundan los afloramientos.
- ⇒ Existe una gran variabilidad en cuanto a las concentraciones de microcistinas observadas en los embalses de la Comunidad de Madrid, destacando el embalse de Santillana por las elevadas concentraciones de microcistinas que presenta.



- ⇒ En el embalse de Santillana se ha encontrado un cambio en las estirpes de *M. aeruginosa*, definidas por una variación en el gen *mcyB*. Esta variación conduce a un cambio en el patrón de toxinas observadas. La variación genotípica puede responder a una variación de las condiciones ecológicas.
- ⇒ La técnica de espectrometría de masas, Maldi-TOF, ha permitido identificar diferentes quimiotipos de cianobacterias tóxicas que se podrían asimilar a diferentes genotipos. Esta técnica ha mostrado una elevada diversidad quimiotípica en un único afloramiento aunque la biomasa de dicho afloramiento está dominada por sólo dos quimiotipos
- ⇒ Los potenciales productores de anatoxina-a son comunes en los embalses españoles, pero eso no se refleja en la importancia de esta toxina en nuestro país donde puede considerarse una toxina rara. El principal productor conocido *A. flos-aquae* parece compuesta en nuestro país por estirpes no productoras de este tipo de compuestos, con una única excepción en el embalse de Rosarito.
- ⇒ Se ha detectado un afloramiento de *Aph. ovalisporum* en el embalse de Arcos, siendo esta la primera ocasión en que un afloramiento así ha sido descrito en España y una de las primeras veces que en que este organismo es descrito en Europa.
- ⇒ Por primera vez se ha encontrado cilindrospermopsina en España. Las concentraciones encontradas son muy elevadas, dos ordenes de magnitud superiores a las publicadas hasta la fecha en Europa.
- ⇒ Los hallazgos de nuestros trabajos hacen recomendable monitorizar de manera regular los cuerpos de agua que se usen para consumo humano y que presenten cianobacterias potencialmente productoras de toxinas en algún momento del año.



Bibliografia

Bibliografia



- Abdel-rahman S, Elayouty YM, y Kamael HA (1993)
Characterization of heptapeptide toxins extracted from *Microcystis aeruginosa* (egyptian isolate) - comparison with some synthesized analogs. International Journal of Peptide and Protein Research 41: 1-7.
- Adams DG (2000)
Heterocyst formation in cyanobacteria. Current Opinion in Microbiology 3:618-624
- Aboal M y Puig MA (2005)
Intracellular and dissolved microcystin in reservoirs of the river Segura basin, Murcia, SE Spain. Toxicon 45: 509-518.
- Aboal M, Puig MA, y Asencio AD (2005)
Production of microcystins in calcareous mediterranean streams: the Alharabe river, Segura river basin in south-east Spain. Journal of Applied Phycology 17: 231-243
- Almodovar A, Nicola GG, y Nuevo M (2004)
Effects of a bloom of *Planktothrix rubescens* on the fish community of a Spanish reservoir. Limnetica 23: 167-175.
- Alonso-Andicoberry C, Garcia-Villada L, Lopez-Rodas V, y Costas E (2002)
Catastrophic mortality of flamingos in a Spanish National Park caused by cyanobacteria. Veterinary Record 151: 706-707.
- APHA (1998)
Standard methods for the examination of water and wastewater. Standard methods for the examination of water and wastewater (ed: Clesceri L, Greenberg V, y Eaton A). American Public Health Association, Washington D.C.
- Araoz, R.; Nghiem, H. O.; Rippka, R.; Palibroda, N.; De Marsac, N. T., y Herdman, M (2005)
Neurotoxins in axenic oscillatorian cyanobacteria: coexistence of anatoxin-a and homoanatoxin-a determined by ligand-binding assay and GC/MS. Microbiology-SGM 151:1263-1273.
- Ariosa Y, Carrasco D, Leganes F, Quesada A, y Fernandez-Valiente E (2005)
Development of cyanobacterial blooms in valencian rice fields. Biology and Fertility of Soils 41: 129-133.
- Azevedo SMFO, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, y Eaglesham GK (2002)
Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. Toxicology 181: 441-446.
- Baldia SF, Conaco MCG, Nishijima T, Imanishi S, y Harada KI (2003)
Microcystin production during algal bloom occurrence in Laguna De Bay, the Philippines. Fisheries Science 69: 110-116.
- Ballot A, Krienitz L, Kotut K, Wiegand C, Metcalf JS, Codd GA, y Pflugmacher S (2004)
Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in three alkaline rift valley lakes of Kenya - Lakes Bogoria, Nakuru and Elmenteita. Journal of Plankton Research 26: 925-935.
- Banker R, Carmeli S, Hadas O, Teltsch B, Porat R, y Sukenik A (1997)
Identification of Cylindrospermopsin in Aphanizomenon Ovalisporum (Cyanophyceae) Isolated From Lake Kinneret, Israel. Journal of Phycology 33: 613-616.
- Barco M, Flores C, Rivera J, y Caixach J (2004)
Determination of microcystin variants and related peptides present in a water bloom of *Planktothrix (Oscillatoria) rubescens* in a Spanish drinking water reservoir by LC/ESI-MS. Toxicon 44: 881-886.



- Barco M, Lawton LA, Rivera J, y Caixach J (2005)
Optimization of intracellular microcystin extraction for their subsequent analysis by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography a* 1074: 23-30.
- Barco M, Rivera J, y Caixach J (2002)
Analysis of Cyanobacterial Hepatotoxins in Water Samples by Microbore Reversed-Phase Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography a* 959: 103-111.
- Bartram J, Carmichael WW, Chorus I, Jones G, y Skulberg OM (1999)
Introduction. *Toxic Cyanobacteria in Water*. (ed: Chorus I, y Bartram J) E & F.N. Spon, London pp 1-14.
- Bazzichelli G y Abdelahad N (1994)
Caractérisation morphométrique et statistique de deux populations d'Aphanizomenon du group Aphanizomenon ovalisporum Forti des Lacs de Nemi et Albano (Italie). *Archiv Fur Hydrobiologie algological studies* 73: 1-21.
- Beltran EC, y Neilan BA (2000)
Geographical segregation of the neurotoxin-producing cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Applied and Environmental Microbiology* 2000 66: 4468-4474.
- Berger C, Ba N, Gugger M, Bouvy M, Rusconi F, Coute A, Troussellier M, y Bernard C (2006)
Seasonal Dynamics and Toxicity of *Cylindrospermopsis Raciborskii* in Lake Guiers (Senegal, West Africa). *FEMS Microbiology Ecology* 57: 355-366.
- Bernard C, Harvey M, Briand JF, Bire R, Krysz S, y Fontaine JJ (2003)
Toxicological Comparison of Diverse *Cylindrospermopsis Raciborskii* Strains: Evidence of Liver Damage Caused by a French C-Raciborskii Strain. *Environmental Toxicology* 18: 176-186.
- Bisby TA (1995)
Characterization of biodiversity. *Global biodiversity assessment* (ed: Heywood VH, y Watson RT). Cambridge University Press, Cambridge pp 21-106.
- Börner T y Dittmann E (2005)
Molecular biology of cyanobacterial toxins. Genetic basic of microcystin production. *Harmful Cyanobacteria* (ed: Huisman J, Matthijs HCP, Visser PM). Springer, Dordrecht pp 25-40.
- Bourne DG, Jones GJ, Blakeley RL, Jones A, Negri AP, y Riddles P (1996)
Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4086-4094.
- Briand JF, Lebourlanger C, Humbert JF, Bernard C, y Dufour P (2004)
Cylindrospermopsis Raciborskii (Cyanobacteria) Invasion at Mid-Latitudes: Selection, Wide Physiological Tolerance, or Global Warming? *Journal of Phycology* 40: 231-238.
- Briand JF, Robillot C, Quiblier-Lloberas C, y Bernard C (2002)
A perennial bloom of *Planktothrix agardhii* (Cyanobacteria) in a shallow eutrophic french Lake: Limnological and microcystin production studies. *Archiv Fur Hydrobiologie* 153: 605-622.
- Briand, JF, Jacquet S. Bernard C, y Humbert JF (2003)
Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research* 34:361-377.
- Bruno M, Barbini DA, Pierdominici E, Serse AP, y Ioppolo A (1994)
Anatoxin-a and a previously unknown toxin in *Anabaena planctonica* from blooms found in Lake Mulargia (Italy). *Toxicon* 32:369-373.



- Bumke-Vogt C, Mailahn W, y Chorus I
Anatoxin-a and neurotoxic cyanobacteria in German lakes and reservoirs. *Environmental Toxicology* 14:117-125.
- Burgoyne DL, Hemscheidt TK, Moore RE, y Runnegar MTC (2000)
Biosynthesis of Cylindrospermopsin. *Journal of Organic Chemistry* 65: 152-156.
- Burns CW (1968)
The relationship between body size of filter-feeding Cladocera and the maximum size of particle ingested. *Limnology and Oceanography* 13: 675-678.
- Campbell DL, Lawton LA, Beattie KA, y Codd GA (1994)
Comparative assessment of the specificity of the brine shrimp and Microtox Assays to hepatotoxic (microcystin-LR-containing) cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality* 9: 71-77.
- Candfield DE Jr, Philips E, y Duarte CM (1989)
Factors influencing the abundance of blue-green algae in Florida lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46: 1232-1237.
- Cane DE, Walsh CT, y Khosla C (1998)
Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* 282: 63-68.
- Caraco NF y Miller R (1998)
Effects of CO₂ on competition between a cyanobacterium and Eukaryotic Phytoplankton. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 54-62.
- Carmichael WW, Beasley V, Bunner DL, Eloff JN, Falconer I, Gorham P, Harada K, Krishnamurthy T, Min-Juan Y, Moore RE, Rinehart K, Runnegar M, Skulberg OM, y Watanabe M (1988)
Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* 26: 971-973.
- Carmichael WW, Biggs DF, y Peterson, MA (1979)
Pharmacology of anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1. *Toxicon* 17:229-236.
- Carmichael, W. W (1997)
The Cyanotoxins. *Advances in Botanical Research* (ed. Callow J.): Academic Press, London pp. 211-256.
- Carrasco D, Moreno E, Sanchis D, Wormer L, Paniagua T, Del Cueto A, y Quesada A (2006)
Cyanobacterial abundance and microcystin occurrence, in Mediterranean water reservoirs in central Spain: microcystins in the Madrid area. *European Journal of Phycology* 41: 281-291.
- CEDEX. Estudio de cianotoxinas y citotoxicidad en la fracción sestónica y en aguas de embalses utilizados para el baño. Madrid (España): CEDEX.
- Challis GL, Ravel J, y Townsend CA (1999)
Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetases adenylation domains. *Chemistry and Biology* 7: 211-224.
- Chittick E, Puschner B, Walsh M, Gearhart S, St. Leger J, Skoncelas E, y Branch S. Blue-green algae microcystin toxicosis in captive Chilean flamingos. *Proceeding of the American Association of Zoo Veterinarians* . 2002.
- Chonudomkul D, Yongmanitchai W, Theeragool G, Kawachi M, Kasai F, Kaya K, y Watanabe MM (2004)
Morphology, Genetic Diversity, Temperature Tolerance and Toxicity of *Cylindrospermopsis Raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) Strains From Thailand and Japan. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 345-355.



- Chorus I (2005)
Editorial and summary. Current approaches to cyanotoxins risk assessment, risk management and regulations in different Countries. Umweltbundesamt, Dessau, Germany, pp 1-8
- Christiansen G, Fastner J, Erhard M, Borner T, y Dittmann E (2003)
Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. Journal of Bacteriology 185: 564-572
- Cirik AS, Coute A, y Cirik S (1992)
Quelques Cyanophycées Rares du lac de Bafa (Turquie). Cryptogamie Algologie 13: 235-246.
- Claska, M. E. y Gilbert, J. J. The effect of temperature on the response of daphnia to toxic cyanobacteria. Freshwater Biology. 1998; 39:221-232.
- Claußner Y, Ziemert N, Tandeau de Marsac N, Börner T y Dittmann E. (2004)
Microcystin – an intercellular signal molecule? 6th International Conference on Toxic Cyanobacteria. Bergen 21.-27-6-2004 (oral presentation)
- Codd GA, Lindsay J, Young FM, Morrison LF, y Metcalf JS (2005a)
Harmful cyanobacteria. . Harmful Cyanobacteria (ed: Huisman J, Matthijs HCP, Visser PM). Springer, Dordrecht pp 1-23.
- Codd GA, Lindsay J, Young FM, Morrison LF, y Metcalf JS (2005b)
Harmful cyanobacteria: from mass mortalities to management measures. Toxicology and Applied Pharmacology 203: 264-272.
- Cook CM, Vardaka E, y Lanaras T (2004)
Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters, 1987-2000: occurrence, toxicity, and impacts in the Mediterranean region. Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica 32: 107-124
- Cronberg G, Annadotter H, y Lawton LA (1999)
The occurrence of toxic Blue-Green algae in Lake Ringsjon, southern Sweden, despite nutrient reduction and fish biomanipulation. Hydrobiologia 404: 123-129
- Dawson RM (1998)
The toxicology of microcystins. Toxicon 36: 953-962.
- De Magalhaes VF, Soares RM, y Azevedo SMFO (2001)
Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): Ecological implication and human health risk. Toxicon 39: 1077-1085
- Demott WR, Zhang QX, y Carmichael WW (1991)
Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and 3 species of *Daphnia*. Limnology and Oceanography 36: 1346-1357.
- Desikachary TV (1959)
Cyanophyta. New Delhi, India: Indian Council of Agricultural Research;.
- Devlin JP, Edwards OE, Gorham PR, Hunter NR, Pike RK, y Stavrí B (1977)
Anatoxin-a, a Toxic Alkaloid From *Anabaena flos-aquae* Nrc-44h. Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie 55: 1367-1371.
- Dittmann E, Neilan BA, Erhard H, von Dohren H, y Borner T (1997)
Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Molecular Microbiology 26: 779-787.
- Domingos P, Rubim TK, Molica RJR, Azevedo Smfo, y Carmichael WW (1999)
First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a northeast brazilian drinking water supply. Environmental Toxicology 14: 31-35.



- Downing JA, Watson SB, y Mccauley E (2001)
Predicting cyanobacteria dominance in lakes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 58: 1905-1908.
- Edwards C, Beattie KA, Scrimgeour CM, y Codd GA (1992)
Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green-algae) and in associated dog poisonings at loch Insh, Scotland. Toxicon 30:1165-1175.
- Elser JL (1999)
The pathway to noxious cyanobacteria blooms in lakes: the food web as the final turn. Freshwater Biology 42: 537-543.
- Fabbro L, Baker M, Duivenvoorden L, Pegg G, y Shiel R (2001)
The Effects of the Ciliate Paramecium Cf. Caudatum Ehrenberg on Toxin Producing Cylindrospermopsis Isolated From the Fitzroy River, Australia. Environmental Toxicology 16: 489-497.
- Falconer I, Jackson A, Langley J, y Runnegar M (1980)
Liver pathology of a toxin From the bloom-forming Blue-Green alga *Microcystis aeruginosa*. Proceedings of the Australian Biochemical Society 13: 41.
- Falconer IR (2005)
Is there a human health hazard from microcystins in the drinking water supply? Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica 33: 64-71.
- Falconer IR y Humpage AR (2001)
Preliminary Evidence for in Vivo Tumour Initiation by Oral Administration of Extracts of the Blue-Green Alga Cylindrospermopsis Raciborskii Containing the Toxin Cylindrospermopsin. Environmental Toxicology 16: 192-195.
- Falconer IR y Humpage AR (2006)
Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins in Water Supplies: Cylindrospermopsins. Environmental Toxicology 21: 299-304.
- Falconer IR y Humpage AR (2006)
Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins in Water Supplies: Cylindrospermopsins. Environmental Toxicology 21: 299-304.
- Falconer IR, Beresford AM, y Runnegar MTC (1983)
Evidence of liver-damage by toxin from a bloom of the Blue-Green alga, *Microcystis aeruginosa*. Medical Journal of Australia 1: 511-514.
- Fastner J, Erhard M, y Von Dohren H (2001)
Determination of oligopeptide diversity within a natural population of microcystis Spp. (Cyanobacteria) by typing single colonies by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. Applied and Environmental Microbiology 67: 5069-5076.
- Fastner J, Flieger I, y Neumann U (1998)
Optimised extraction of microcystins from field samples - a comparison of different solvents and procedures. Water Research 32: 3177-3181.
- Fastner J, Heinze R, Humpage AR, Mischke U, Eaglesham GK, y Chorus I (2003)
Cylindrospermopsin Occurrence in Two German Lakes and Preliminary Assessment of Toxicity and Toxin Production of Cylindrospermopsis Raciborskii (Cyanobacteria) Isolates. Toxicon 42: 313-321.
- Fastner J, Neumann U, Wirsing B, Weckesser J, Wiedner C, Nixdorf B, y Chorus I (1999)
Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh water bodies. Environmental Toxicology 14: 13-22.



Bibliografia

- Fastner J, Rucker J, Stuken A, Preussel K, Nixdorf B, Chorus I, Kohler A, y Wiedner C (2007)
Occurrence of the Cyanobacterial Toxin Cylindrospermopsin in Northeast Germany.
Environmental Toxicology 22: 26-32.
- Fawell JK, Mitchell RE, Hill RE, y Everett DJ (1999)
The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II Anatoxin-a. Human & Experimental
Toxicology 8: 168-173.
- Finking R, y Marahiel MA (2004)
Biosynthesis of nonribosomal peptides. Annual Review of Microbiology 58: 453-488.
- Froschio SM, Humpage AR, Burcham PC, y Falconer IR (2001)
Cell-Free Protein Synthesis Inhibition Assay for the Cyanobacterial Toxin Cylindrospermopsin.
Environmental Toxicology 16: 408-412.
- Furey A, Crowley J, Shuilleabhain AN, Skulberg AM, y James K J (2003)
The first identification of the rare cyanobacterial toxin, homoanatoxin-a, in Ireland. Toxicon 41:
297-303.
- Gallon JR, Kittakoop P, y Brown EG (1994)
Biosynthesis of anatoxin-a by *Anabaena flos-aquae* - examination of primary enzymatic steps.
Phytochemistry. 1994; 35:1195-1203.
- Geitler L (1932)
Cyanophyceae von Europa. In: Cyanophyceae von Europa. Akademische Verlags Gessellschaft,
Leipzig, Germany.
- Gibson CE, y Smith RV (1982)
Freshwater plankton. The biology of the Cyanobacteria (ed: Carr NC, y Whitton BA). Blackwell
Scientific, Oxford pp 463-490.
- Gilbert JJ (1994)
Susceptibility of planktonic rotifers to a toxic strain of *Anabaena flos-aquae*. Limnology and
Oceanography 39:1286-1297.
- Gilbert JJ (1996a)
Effect of food availability on the response of planktonic rotifers to a toxic strain of the
Cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. Limnology and Oceanography 41: 1565-1572.
- Gilbert JJ (1996b)
Effect of temperature on the response of planktonic rotifers to a toxic cyanobacterium. Ecology
77: 1174-1180.
- Gkelis S, Moustaka-Gouni M, Sivonen K, y Lanaras T (2005)
First Report of the Cyanobacterium *Aphanizomenon Ovalisporum* Forti in Two Greek Lakes and
Cyanotoxin Occurrence. Journal of Plankton Research 27: 1295-1300.
- Goldberg J, Huang HB, Kwon YG, Greengard P, Nairn AC, y Kuriyan J (1995)
3-Dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1.
Nature 376: 745-753.
- Graham JL, Jones JR, Jones SB, Downing JA, y Clevenger TE (2004)
Environmental factors influencing microcystin distribution and concentration in the midwestern
United States. Water Research 38: 4395-4404.
- Griffiths DJ y Saker ML (2003)
The Palm Island Mystery Disease 20 Years on: a Review of Research on the Cyanotoxin
Cylindrospermopsin. Environmental Toxicology 18: 78-93.



- Gulledge BM, Aggen JB, Huang HB, Nairn AC, y Chamberlin AR (2002)
The microcystins and nodularins: Cyclic polypeptide inhibitors of PP1 and PP2a. *Current Medicinal Chemistry* 9: 1991-2003.
- Gustafsson S y Hansson LA (2004)
Development of tolerance against toxic cyanobacteria in *Daphnia*. *Aquatic Ecology* 38: 37-44.
- Hadas O, Pinkas R, Malinsky-Rushansky N, Shalev-Alon G, Delphine E, Berner T, Sukenik A, y Kaplan A (2002)
Physiological variables determined under laboratory conditions may explain the bloom of *Aphanizomenon ovalisporum* in Lake Kinneret. *European Journal of Phycology* 37: 259-257.
- Harada K y Tsuji K (1998)
Persistence and decomposition of hepatotoxic microcystins produced by cyanobacteria in natural environment. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews* 17: 385-403.
- Harada K, Ohtani I, Iwamoto K, Suzuki M, Watanabe MF, Watanabe M, y Terao K (1994)
Isolation of Cylindrospermopsin From a Cyanobacterium Umezakia Natans and Its Screening Method. *Toxicon* 32: 73-84.
- Harada K.I., Tsuji H., Watanabe M.F., y Kondo F. (1996)
Stability of microcystins from cyanobacteria—III. Effect on pH and temperature. *Phycologia* (suppl) 35: 83-88.
- Hecky RE y Kilham P (1988)
Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment. *Limnology and Oceanography* 33: 796-822.
- Hemscheidt T, Rapala J, Sivonen K, y Skulberg OM (1995)
Biosynthesis of anatoxin-a in *Anabaena flos-aquae* and homoanatoxin-a in *Oscillatoria formosa*. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* 13:1361-1362..
- Henriksen P (1996)
Microcystin profiles and content in Danish populations of cyanobacteria/blue-green algae as determined by HPLC. *Phycologia* 35: 102-110.
- Henriksen P y Moestrup O (1997)
Seasonal variations in microcystin contents of Danish cyanobacteria. *Natural Toxins* 5: 99-106
- Herdman M (1988)
Cellular differentiation: akinetes. *Methods in Enzimology* (ed. Packer L, y Glazer AN). Academic Press. San Diego pp 222-232.
- Hesse K, Dittmann E, y Borner T (2001)
Consequences of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *FEMS Microbiology Ecology* 37: 39-43.
- Hisbergues M, Christiansen G, Rouhiainen L, Sivonen K, y Borner T (2003)
PCR-Based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of Microbiology* 180: 402-410.
- Huber AL (1985)
Factors Affecting the germination of akinetes of *Nodularia spumigena* (Cyanobacteriaceae). *Applied and Environmental Microbiology* 49: 73-78.
- Huisman J y Hulot F.D. (2005)
Population dynamics of harmful cyanobacteria. *Harmful Cyanobacteria*(ed: Huisman J, Matthijs HCP, Visser PM). Springer, Dordrecht pp 143-176.



- Huisman J y Weissing FJ (2001)
Biological conditions for oscillations and chaos generated by multispecies competition. *Ecology* 82: 2682-2695.
- Hulot FD y Huisman J (2004)
Allelopathic interactions between phytoplakton species: the roles of heterotrophic bacteria and mixing intensity. *Limnology and Oceanography* 49: 1424-1434.
- Humpage AR y Falconer IR (2003)
Oral Toxicity of the Cyanobacterial Toxin Cylindrospermopsin in Male Swiss Albino Mice: Determination of No Observed Adverse Effect Level for Deriving a Drinking Water Guideline Value. *Environmental Toxicology* 18: 94-103.
- Humpage AR, Fenech M, Thomas P, y Falconer IR (2000)
Micronucleus Induction and Chromosome Loss in Transformed Human White Cells Indicate Clastogenic and Aneugenic Action of the Cyanobacterial Toxin, Cylindrospermopsin. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 472: 155-161.
- Humpage AR, Fontaine F, Froscio S, Burcham P, y Falconer IR (2005)
Cylindrospermopsin Genotoxicity and Cytotoxicity: Role of Cytochrome P-450 and Oxidative Stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* 68: 739-753.
- Hyenstrand P, Blomqvist P, y Petterson A (1998)
Factors determining cyanobacterial success in aquatic systems - a literature review. *Archives fur Hydrobiologie* 15: 41-62.
- Ito E, Takai A, Kondo F, Masui H, Imanishi S, y Harada K (2002)
Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds. *Toxicon* 40: 1017-1025
- James J, Crowley J, Hamilton B, Lahane M, Skulberg O, y Ambrose F (2005)
Anatoxins and degradation products, determined using hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion-trap mass spectrometry: forensic investigation of cyanobacterial neurotoxins poisoning. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19: 1165-1175.
- James KJ, Sherlock IR, y Stack MA (1997)
Anatoxin-a in Irish freshwater and cyanobacteria, determined using a new fluorimetric liquid chromatographic method. *Toxicon* 35: 963-971.
- James KJ, y Sherlock IR (1996)
Determination of the cyanobacterial neurotoxin, anatoxin-a, by derivatisation using 7-Fluoro-4-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazole (NBD-F) and HPLC analysis with fluorimetric detection . *Biomedical Chromatography* 10: 46-47.
- Jang MH, Ha K, Joo GJ, y Takamura N (2003)
Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshwater Biology* 48: 1540-1550.
- Kangatharalingam N, y Priscu JC (1993)
Isolation and verification of anatoxin-a producing clones of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb) De Breb from a eutrophic lake. *FEMS Microbiology Ecology* 12: 127-130.
- Kansiz M, Heraud P, Wood B, Burden F, Beardall J, y McNaughton D (1999)
Fourier transform infrared microspectroscopy and chemometrics as tools for the discrimination of cyanobacterial strains. *Phytochemistry* 52: 407-417.
- Kardinaal WEA y Visser PM (2005)
Dynamics of cyanobacterial toxins. Sources of variability in microcystin concentration Harmful Cyanobacteria (ed: Huisman J, Matthijs HCP, Visser PM). Springer, Dordrecht pp 25-40.



- Kearns KD y Hunter MD (2000)
Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium. *Environmental Microbiology* 2: 291-297.
- Kearns KD y Hunter MD (2001)
Toxin-producing *Anabaena flos-aquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. *Microbial Ecology* 42: 80-86.
- Kellmann R, Mills T, y Neilan BA (2006)
Functional Modeling and Phylogenetic Distribution of Putative Cyindrospermopsin Biosynthesis Enzymes. *Journal of Molecular Evolution* 62: 267-280.
- Kim BC, Kim EK, Pyo DJ, Park HD, y Heo WM (1995)
Toxin cyanobacterial blooms in Korean Lakes. *Journal of Korean Society of Water Quality* 11: 231-237.
- Kim SG, Rhee SK, Ahn CY, Ko SR, Choi GG, Bae JW, Park YH, y Oh HM (2006)
Determination of cyanobacterial diversity during algal blooms in Daechung Reservoir, Korea, on the basis of CPCBA intergenic spacer region analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3252-3258.
- Kiss T, Vehovszky A, Hiripi L, Kovacs A, y Voros L (2002)
Membrane Effects of Toxins Isolated From a Cyanobacterium, *Cylindrospermopsis Raciborskii*, on Identified Molluscan Neurons. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 131: 167-176.
- Komarek J (1984)
Sobre las cianofíceas de Cuba: (3) Especies planctónicas que forman florecimientos de las aguas. (ciudad de la Habana). *Acta Botanica Cubana* 19: 1-33.
- Komarek J y Anagnostidis K (1986)
Modern approach to the classification-system of Cyanophytes 2. Chroococcales. *Archiv Fur Hydrobiologie algological studies* 73: 157-226.
- Komarek J y Anagnostidis K (1989)
Modern approach to the classification-system of Cyanophytes 4 - Nostocales. *Archiv Fur Hydrobiologie algological studies* 82: 247-345.
- Komarek J y Anagnostidis K (1999)
Süßwasserflora von mitteleuropa band 19/1. Cyanoprokaryota. 1. Teil: Chroococcales. Berlin. (ed: Ettl H, Gartner G, Heynig H, y Mollenhauer D).
- Konz D y Marahiel MA (1999)
How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chemistry and Biology* 6: R39-R48
- Kotak BG, Lam AKY, Prepas EE, Kenefick SL, y Hrudey SE (1995)
Variability of the hepatotoxin microcystin-LR in hypereutrophic drinking-water lakes. *Journal of Phycology* 31: 248-263.
- Kouzminov, A. New Zealand: Risk assessment, management and regulatory approach for cyanobacteria and cyanotoxins in drinking-water. Current approaches to cyanotoxins risk assessment, risk management and regulations in different Countries. Dessau, Germany: Umweltbundesamt; 2005; pp. 93-98.
- Krienitz L, Ballot A, Kotut K, Wiegand C, Putz S, Metcalf JS, Codd GA, y Pflugmacher S (2003)
Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of lesser flamingos at Lake Bogoria, Kenya. *FEMS Microbiology Ecology* 43: 141-148.
- Kurmayer R, Dittmann E, Fastner J, y Chorus I (2002)



Bibliografia

- Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* Spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microbial Ecology* 43: 107-118.
- Laamanen MJ, Forsstrom L, y Sivonen K (2002)
Diversity of *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacterium) populations along a Baltic sea salinity gradient. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5296-5303.
- Laamanen MJ, Gugger MF, Lehtimäki JM, Haukka K, y Sivonen K (2001)
Diversity of toxic and nontoxic *Nodularia* isolates (Cyanobacteria) and filament from the Baltic sea. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4638-4647.
- Lahti K, Rapala J, Fardig M, Niemela M, y Sivonen K (1997)
Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water. *Water Research* 31: 1005-1012.
- Lawton LA, Edwards C, y Codd GA (1994)
Extraction and High-Performance Liquid-Chromatographic Method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* 119: 1525-1530.
- Li RH, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, Liu YD, y Watanabe MM (2001)
First Report of the Cyanotoxins Cylindrospermopsin and Deoxycylindrospermopsin From *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 37: 1121-1126.
- Maatouk I, Bouaicha N, Fontan D, y Levi Y (2002)
Seasonal variation of microcystin concentrations in the Saint-Caprais Reservoir (France) and their removal in a small full-scale treatment plant. *Water Research* 36: 2891-2897.
- Mackintosh RW, Dalby KN, Campbell DG, Cohen PTW, Cohen P, y Mackintosh C (1995)
The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to Cysteine-273 on protein phosphatase-1. *FEBS Letters* 371: 236-240.
- Makino F y Tsuzaki J (1971)
Absence of histone in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Nature* 231: 446-447.
- Margalef R (1983)
Limnología. In: *Limnología*. Ediciones Omega S.A., Barcelona (España).
- Marker AF, Nush EA, Rai H, y Riemann B (1980)
The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusions and recommendations. *Archiv für Hydrobiologie* 14: 91-106.
- Martin-Luna B, Sevilla E, Hernandez JA, Bes MT, Fillat MF, y Peleato ML (2006)
Fur from *Microcystis aeruginosa* binds in vitro promoter regions of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Phytochemistry*, 67 : 876-881.
- Matsunaga S, Moore RE, Niemczura WP, y Carmichael WW (1989)
Anatoxin-a(S), a Potent Anticholinesterase From *Anabaena flos-aquae*. *Journal of the American Chemical Society* 111: 8021-8023.
- Meriluoto J y Spoof L (2005)
SOP: Analysis of microcystins by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. : *Toxic Cyanobacterial Monitor and Cyanotoxin Analysis*. Abo, Finland, pp 77-84.
- Metcalf JS y Codd GA (2004)
Cyanobacterial toxins in the water environment. *Fundation for Water Research*, Marlow



Bibliografia

- Metcalfe JS, Lindsay J, Beattie KA, Birmingham S, Saker ML, Torokne AK, y Codd GA (2002)
Toxicity of Cylindrospermopsin to the Brine Shrimp *Artemia Salina*: Comparisons With Protein Synthesis Inhibitors and Microcystins. *Toxicon* 40: 1115-1120.
- Mikalsen B, Boison G, Skulberg OM, Fastner J, Davies W, Gabrielsen TM, Rudi K, y Jakobsen KS (2003)
Natural variation in the microcystin synthetase operon *McyABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *Journal of Bacteriology* 185: 2774-2785.
- Mitrovic SM, Pflugmacher S, James KJ, y Furey A (2004)
Anatoxin-a elicits an increase in peroxidase and glutathione S-transferase activity in aquatic plants. *Aquatic Toxicology* 68: 185-192.
- Moore BS (1999)
Biosynthesis of marine natural products: Microorganisms and Macroalgae. *Natural Product Reports* 16: 653-674.
- Moreno I, Repetto G, Carballal E, Gago A, y Camean AM (2005)
Cyanobacteria and microcystins occurrence in the Guadiana River (Sw Spain). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 85: 461-474.
- Moreno IM, Pereira P, Franca S, y Camean A (2004)
Toxic cyanobacteria strains isolated from blooms in the Guadiana river (Southwestern Spain). *Biological Research* 37: 405-417.
- Namikoshi M, Murakami T, Watanabe MF, Oda T, Yamada J, Tsujimura S, Nagai H, y Oishi S (2003)
Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon* 42: 533-538.
- Necchi O, Dip MR, y Goes RM (1991)
Macroalgae of a stream in Southeastern Brazil - composition, seasonal-variation and relation to physical and chemical-variables. *Hydrobiologia* 213: 241-250.
- Neilan BA, Saker ML, Fastner J, Torokne A, y Burns BP (2003)
Phylogeography of the Invasive Cyanobacterium *Cylindrospermopsis Raciborskii*. *Molecular Ecology* 12: 133-140.
- Nielsen SL (2006)
Size-Dependent Growth Rates in Eukaryotic and Prokaryotic Algae Exemplified by Green Algae and Cyanobacteria: Comparisons Between Unicells and Colonial Growth Forms. *Journal of Plankton Research* 28: 489-498.
- Nishiwaki-Matsushima R, Nishiwaki S, Ohta T, Yoshizawa S, Suganuma M, Harada K, Watanabe MF, y Fujiki H (1991)
Structure-function-relationships of microcystins, liver-tumor promoters, in interaction with protein phosphatase. *Japanese Journal of Cancer Research* 82: 993-996.
- Nishizawa T, Ueda A, Asayama M, Fujii K, Harada K, Ochi K, y Shirai M (2000)
Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. *Journal of Biochemistry* 127 : 779-789.
- Nogueira ICG, Lobo-Da-Cunha A, y Vasconcelos VM (2006)
Effects of *Cylindrospermopsis Raciborskii* and *Aphanizomenon Ovalisporum* (Cyanobacteria) Ingestion on *Daphnia Magna* Midgut and Associated Diverticula Epithelium. *Aquatic Toxicology* 80: 194-203.



- Nogueira ICG, Saker ML, Pflugmacher S, Wiegand C, y Vasconcelos VM (2004)
Toxicity of the Cyanobacterium *Cylindrospermopsis Radborskii* to *Daphnia Magna*.
Environmental Toxicology 19: 453-459.
- Norris RL, Eaglesham GK, Pierens G, Shaw GR, Smith MJ, Chiswell RK, Seawright AA, y Moore MR (1999)
Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin From cylindrospermopsis
Raciborskii. *Environmental Toxicology* 14: 163-165.
- Norris RLG, Eaglesham GK, Shaw GR, Senogles P, Chiswell RK, Smith MJ, Davis BC, Seawright AA, y Moore MR (2001)
Extraction and Purification of the Zwitterions Cylindrospermopsin and
Deoxycylindrospermopsin From *Cylindrospermopsis Raciborskii*. *Environmental Toxicology*
16: 391-396.
- Oh HM, Lee SJ, Kim JH, Kim HS, y Yoon BD (2001)
Seasonal Variation and Indirect Monitoring of Microcystin Concentrations in Daechung
Reservoir, Korea. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1484-1489.
- Oliver RL (1994)
Floating and Sinking in Gas-Vacuolate Cyanobacteria. *Journal of Phycology* 30: 161-173.
- Oliver RL, y Ganf GG (2000)
Freshwater blooms. The ecology of Cyanobacteria: their Diversity in Time and Space (ed:
Whitton BA, y Potts M). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht pp. 149-194.
- Park HD, Kim B, Kim E, y Okino T (1998)
Hepatotoxic microcystins and neurotoxic anatoxin-a in cyanobacterial blooms from Korean
lakes. *Environmental Toxicology and Water Quality* 13: 225-234.
- Park HD, Watanabe MF, Harda K, Nagai H, Suzuki M, Watanabe M, y Hayashi H (1993)
Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains
of cyanobacteria from Japanese freshwaters. *Journal of Natural Toxins* 1: 353-360.
- Parsons TR y Strickland JDH (1963)
Discussion of spectrophotometric determination of marine plant pigments, with revised
equations for ascertaining chlorophyll and carotenoids. *Journal of Marine Research* 21: 155-163.
- Pearl HW, Fulton RS, Moisander PH, y Dyble J (2001)
Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacterial. *Science World* 1: 76-113
- Pearson LA, Hisbergues M, Borner T, Dittmann E, y Neilan BA (2004)
Inactivation of an ABC transporter gene, *mcvH*, results in loss of microcystin production in the
cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology*
70: 6370-6378.
- Pflugmacher S (2002)
Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic
ecosystems. *Environmental Toxicology* 17: 407-413.
- Pollingher U, Hadas O, Yacobi YZ, Zohary T, y Berman T (1998)
Aphanizomenon ovalisporum (Forti) in Lake Kinneret, Israel. *Journal of Plankton Research* 20:
1321-1339.
- Preussel K, Stuken A, Wiedner C, Chorus I, y Fastner J (2006)
First Report on Cylindrospermopsin Producing *Aphanizomenon Flos-Aquae* (Cyanobacteria)
Isolated From Two German Lakes. *Toxicon* 47: 156-162.
- Purves KP, Orians GH, y Heller HG (1992)



Life: The science of biology. Sinauer Associates. Boston.

- Quesada A, Moreno E, Carrasco D, Paniagua T, Wormer L, De Hoyos C, y Sukenik A (2006)
Toxicity of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) in a Spanish Water Reservoir.
European Journal of Phycology 41: 39-45.
- Quesada A, Sanchis D, y Carrasco D (2002)
Cyanobacteria in Spanish reservoirs. How frequently are they toxic? *Limnetica* 23: 109-118.
- Rajaniemi P, Hrouzek P, Kastovska K, Willame R, Rantala A, Hoffmann L, Komarek J, y Sivonen K (2005)
Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 11-26.
- Rapala J, Sivonen K, Luukkainen R, y Niemela SI (1993)
Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental-conditions and comparison of growth by toxic and nontoxic *Anabaena*-Strains - a laboratory study. *Journal of Applied Phycology* 5: 581-591.
- Reinikainen M, Lindvall F, Meriluoto JAO, Repka S, Sivonen K, Spoof L, y Wahlsten M (2002)
Effects of dissolved cyanobacterial toxins on the survival and egg hatching of estuarine calanoid copepods. *Marine Biology* 140: 577-583.
- Reynolds CS (1981)
Phytoplankton assemblages and their periodicity in stratifying lake ecosystems. *Holarctic Ecology* 3: 141-149.
- Reynolds CS y Walsby AE (1975)
Water-blooms. *Biological Review* 50: 437-481.
- Reynolds CS, Huszar V, Kruk C, Naselli-Flores L, y Melo S (2002)
Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 24: 417-428.
- Reynolds CS, Jaworski CHM, Cmiech HA, y Leedale GF (1981)
On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kutz. Emend. Elenkin. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 293: 419-477.
- Rinta-Kanto JM y Wilhelm SW (2006)
Diversity of microcystin-producing cyanobacteria in spatially isolated regions of Lake Erie. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5083-5085.
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, y Stanier RY (1979)
Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *The Cyanobacteria. Journal of General Microbiology* 111: 1-61.
- Roberts RD y Zohary T (1987)
Temperature affects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom forming cyanobacteria. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21: 391-399.
- Roelke D y Buyukates Y (2002)
Dynamics of Phytoplankton Succession Coupled to Species Diversity as a System-Level Tool for Study of *Microcystis* Population Dynamics in Eutrophic Lakes. *Limnology and Oceanography* 47: 1109-1118.



- Roger PA y Kolasoorya SA (1980)
Blue-green algae and rice. IRRI. Los Baños.
- Rossello-Mora R y Amann R (2001)
The Species Concept for Prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews 25: 39-67.
- Rouhiainen L, Vakkilainen T, Siemer BL, Buikema W, Haselkorn R, y Sivonen K (2004)
Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* Strain 90. Applied and Environmental Microbiology 70: 686-692.
- Runnegar M, Berndt N, Kong SM, Lee EYC, y Zhang LF (1995)
In-vivo and in-vitro binding of microcystin to protein phosphatase-1 and phosphatase-2a. Biochemical and Biophysical Research Communications 216: 162-169.
- Saker ML, Nogueira ICG, Vasconcelos VM, Neilan BA, Eaglesham GK, y Pereira P (2003)
First Report and Toxicological Assessment of the Cyanobacterium *Cylindrospermopsis* *Raciborskii* From Portuguese Freshwaters. Ecotoxicology and Environmental Safety 55: 243-250.
- Sanchis D, Carrasco D, Padilla C, Leganes F, Fernandez-Valiente E, Del Campo FF, y Quesada A (2002)
Spatial and temporal heterogeneity in succession of cyanobacterial blooms in a Spanish reservoir. Annales De Limnologie-International Journal of Limnology 38: 173-183.
- Sanchis D, Carrasco D, y Quesada A (2004)
The genus *microcystis* (Microcystaceae/Cyanobacteria) from a Spanish reservoir: a contribution to the definition of morphological variations. Nova Hedwigia 79: 479-495.
- Schembri MA, Neilan BA, y Saint CP (2001)
Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis* *Raciborskii*. Environmental Toxicology 16: 413-421.
- Seifert M, McGregor G, Eaglesham G, Wickramasinghe W, y Shaw G (2007)
First Evidence for the Production of *Cylindrospermopsin* and *Deoxy-Cylindrospermopsin* by the Freshwater Benthic Cyanobacterium, *Lyngbya* *Wollei* (Farlow Ex Gormont) *Speziale* and *Dyck*. Harmful Algae 6: 73-80.
- Seigler D.S. (1998)
Plant secondary metabolism. Dordrecht. Kluwer Academic Publisher
- Shalev-Alon G, Sukenik A, Livnah O, Schwarz R, y Kaplan A (2002)
A Novel Gene Encoding Amidinotransferase in the *Cylindrospermopsin* Producing Cyanobacterium *Aphanizomenon* *Ovalisporum*. FEMS Microbiology Letters 209: 87-91.
- Shaw GR, Sukenik A, Livne A, Chiswell RK, Smith MJ, Seawright AA, Norris RL, Eaglesham GK, y Moore MR (1999)
Blooms of the *Cylindrospermopsin* Containing Cyanobacterium, *Aphanizomenon* *Ovalisporum* (Forti), in Newly Constructed Lakes, Queensland, Australia. Environmental Toxicology 14: 167-177.
- Singh DP, Tyagi MB, Kumar A, Thakur JK, y Kumar A (2001)
Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. World Journal of Microbiology & Biotechnology 17: 15-22.
- Sivonen K y Jones G (1999)
Cyanobacterial Toxins. Toxic Cyanobacteria in Water. (ed: Chorus I, y Bratram J) E & F.N. Spon, London pp 39-111.
- Sivonen K, Namikoshi M, Evans WR, Carmichael WW, Sun F, Rouhiainen L, Luukkainen R, y Rinehart KL (1992)



- Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2495-2500.
- Sivonen, K.; Himberg, K.; Luukkainen, R.; Niemela, S. I.; Poon, G. K., y Codd, G. A. Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacteria blooms and strains from Finland. *Toxicity Assessment*. 1989; 4:339-352.
- Sommer U (1989)
Plankton ecology. Springer-Verlag New York.
- Stackebrandt E, y Goebel BM (1994)
A place for DNA-DNA reassociation and 16S Ribosomal-RNA sequence-analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 846-849.
- Tanabe Y, Kaya K, y Watanabe M. (2004)
Evidence for recombination in the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacteria *Microcystis* spp. *Journal of Molecular Evolution* 58: 633-641.
- Tillett D, Dittmann E, Erhard M, Von Dohren H, Borner T, y Neilan BA (2000)
Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology* 7: 753-764.
- Toivola DM, Goldman RD, Garrod DR, y Eriksson JE (1997)
Protein phosphatases maintain the organization and structural interactions of hepatic keratin intermediate filaments. *Journal of Cell Science* 110: 23-33.
- Toivola DM, Omary MB, Ku NO, Peltola O, Baribault H, y Eriksson JE (1998)
Protein phosphatase inhibition in normal and keratin 8/18 assembly-incompetent mouse strains supports a functional role of keratin intermediate filaments in preserving hepatocyte integrity. *Hepatology* 28: 116-128.
- Torokne A, Asztalos M, Bankine M, Bickel H, Borbely G, Carmeli S, Codd GA, Fastner J, Huang Q, Humpage A, Metcalf JS, Rabai E, Sukenik A, Suranyi G, Vasas G, y Weiszfeiler V (2004)
Interlaboratory Comparison Trial on Cylindrospermopsin Measurement. *Analytical Biochemistry* 332: 280-284.
- Trogen GB, Edlund U, Larsson G, y Sethson I (1998)
The solution NMR structure of a Blue-Green algae hepatotoxin, microcystin-RR - a comparison with the structure of microcystin-LR. *European Journal of Biochemistry* 258: 301-312.
- Utermöhl H (1958)
Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. *Mitteilungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 9:1-38.
- Utkilen H y Gjølme N (1995)
Iron stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 797-800.
- Valerio E, Pereira P, Saker ML, Franca S, y Tenreiro R (2005)
Molecular Characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* Strains Isolated From Portuguese Freshwaters. *Harmful Algae* 4: 1044-1052.
- Vardaka E, Moustaka-Gouni M, Cook CM, y Lanaras T (2005)
Cyanobacterial blooms and water quality in Greek waterbodies. *Journal of Applied Phycology* 17: 391-401.
- Vasconcelos VM (1994)
Toxic cyanobacteria (blue-green-algae) in Portuguese fresh-waters. *Arch. Hydrobiol* 130: 439-451.



Bibliografia

- Vasconcelos VM, Sivonen K, Evans WR, Carmichael WW, y Namikoshi M (1996)
Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in Portuguese freshwaters.
Water Research 30: 2377-2384.
- Vezie C, Briant L, Sivonen K, Bertru G, Lefeuvre JC, y Salkinojasalonen M (1997)
Occurrence of microcystin-containing cyanobacterial blooms in freshwaters of Brittany (France).
Archiv Fur Hydrobiologie 139: 401-413.
- Viaggiu, E.; Melchiorre, S.; Volpi, F.; Di Corcia, A.; Mancini, R.; Garibaldi, L.; Crichigno, G., y Bruno, M. Anatoxin-a toxin in the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* from a fishing pond in northern Italy. Environmental Toxicology. 2004a; 19:191-197.
- Via-Ordorika L, Fastner J, Kurmayer R, Hisbergues M, Dittmann E, Komarek J, Erhard M, y Chorus I (2004)
Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies. Syst. Appl. Microbiol. 27: 592-602.
- von Dohren H, Keller U, Vater J, y Zocher R (1997)
Multifunctional peptide synthetases. Chemical Reviews 97: 2675-2705.
- Walsby AE (1987)
Mechanism of buoyancy regulation by planktonic cyanobacteria with gas vesicles . The Cyanobacteria (ed: Fay P, y van Baalen C). Elsevier, Amsterdam pp 377-414.
- Walsby AE, Yacobi YZ, y Zohary T (2003)
Annual changes in the mixed depth and critical depth for photosynthesis by *Aphanizomenon ovalisporum* that allow growth of the cyanobacterium in Lake Kinneret, Israel. Journal of Plankton Research 25: 603-619.
- Watson SB, McCauley E, y Downing JA (1997)
Patterns in phytoplakton taxonomic composition across temperate lake pf different nutrient status. Limnology and Oceanography 42: 487-495.
- Weiss J, Liebert HP, y Braune W (2000)
Influence of Microcystin-RR on growth and photosynthetic capacity of the duckweed *Lemna Minor* L. Journal of Applied Botany 74: 100-105.
- Welker M y Von Dohren H (2006)
Cyanobacterial Peptides - Nature's Own Combinatorial Biosynthesis. FEMS Microbiology Reviews 30: 530-563.
- Welker M, Brunke M, Preussel K, Lippert I, y Von Dohren H (2004)
Diversity and distribution of *Microcystis* (Cyanobacteria) oligopeptide chemotypes from natural communities studied by Single-Colony Mass Spectrometry. Microbiology-SGM 150: 1785-1796.
- Welker M, Hoeg S, y Steinberg C (1999)
Hepatotoxic cyanobacteria in the shallow Lake Muggelsee. Hydrobiologia 409: 263-268
- Welker M, Marsalek B, Sejnohova L, y von Doren H (2006)
Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: Toward an understanding of metabolic diversity. Peptides 27: 2090-2103.
- Welker M, Von Dohren H, Tauscher H, Steinberg CEW, y Erhard M (2003)
Toxic microcystis in shallow Lake Muggelsee (Germany) - dynamics, distribution, diversity. Archiv Fur Hydrobiologie 157: 227-248.



- Whitton BA y Potts M (2000)
Freshwater blooms. In: Whitton BA and Potts M (eds) The ecology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 1-11.
- Wicks RJ y Thiel PG (1990)
Environmental-factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic African reservoir. Environmental Science & Technology 24: 1413-1418.
- Wiegand C y Pflugmacher S (2005)
Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. Toxicology and Applied Pharmacology 203: 201-218.
- Willame R, Jurczak T, Iffly JF, Kull T, Meriluoto J, y Hoffmann L (2005)
Distribution of hepatotoxic cyanobacterial blooms in Belgium and Luxembourg. Hydrobiologia 551: 99-117.
- Wilson AE, Sarnelle O, Neilan BA, Salmon TP, Gehringer MM, y Hay ME (2005)
Genetic variation of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* within and among lakes: implications for harmful algal blooms. Applied and Environmental Microbiology 71: 6126-6133.
- Wolf HU y Frank C (2002)
Toxicity assessment of cyanobacterial toxin mixtures. Environmental Toxicology 17: 395-399.
- Wood SA, Rasmussen JP, Holland PF, Campbell R, y Crowe ALM (2007)
First report of the cyanotoxin anatoxin from *Aphanizomenon issastchenkoi*. Journal of Phycology 43: 356-365.
- Wormer L (2006)
Dinámicas de distribución y biodegradación de la cilindrospermopsina, una cianotoxina novedosa en aguas europeas (Memoria para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados).
Dinámicas de distribución y biodegradación de la cilindrospermopsina, una cianotoxina novedosa en aguas europeas (Memoria para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados).
- Xie LQ, Xie P, Li SX, Tang HJ, y Liu H (2003)
The Low TN : TP Ratio, a Cause or a Result of *Microcystis* Blooms? Water Research 37: 2073-2080.
- Yoshida M, Yoshida T, Takashima Y, Kondo R, y Hiroishi S (2005)
Genetic diversity of toxic cyanobacterium *Microcystis* in lake Mikata. Environmental Toxicology 20: 229-234.
- Yu SZ (1995)
Primary prevention of hepatocellular-carcinoma. Journal of Gastroenterology and Hepatology 10: 674-682.
- Zhou L, Yu H, y Chen K (2002)
Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. Biomedical and Environmental Sciences 15: 166-171.
- Zohary T (2004)
Changes to the phytoplankton assemblage of Lake Kinneret after decades of a predictable, repetitive pattern. Freshwater Biology 49: 1355-1371.

[Http://www.genome.ad.jp/kepp/pathway/map/map00195.html](http://www.genome.ad.jp/kepp/pathway/map/map00195.html)

[Http://linux.nii.res.in/~pkfdb/polyketide.html](http://linux.nii.res.in/~pkfdb/polyketide.html)



Anexo

ANEXO I



Día	NID $\mu\text{g N L}^{-1}$	Fósforo $\mu\text{g P L}^{-1}$	Relación DIN/Ptot
	Total (NO ₂ -,NO ₃ -,NH ₄ +) Total, Soluble	Total, Soluble	
5-9-2002	160,0 (ND, ND, 160,0)	113, nd	1,4
8-10-2003	220,4 (6,4, 47,3, 166,7)	97,2, 26	2,3
15-10-2003	139,1 (ND, 22,4, 116,7)	62, 36	2,2

Tabla 1. Nutrientes encontrados en el punto L2 en los años 2002/2003. ND = no detectado, nd = no determinado.

Día	Temp. (°C)	Turbidez (NTU)	Conductivida d $\mu\text{S cm}^{-1}$	Oxígeno disuelto (mg L^{-1})	pH
5-9-2002	20,2 \pm 0,5	18,6 \pm 0	100 \pm 1	11,9 \pm 0,1	9,95 \pm 0,0
8-10-2003	16,7 \pm 0,2	12,8 \pm 12	85 \pm 0,2	8,19 \pm 0,5	7,34 \pm 0,4
15-10-2003	17,2 \pm 0,1	17,9 \pm 1	84 \pm 0,2	8,71 \pm 0,2	8,71 \pm 0,2

Tabla 2. Variables físico-químicas en el punto L2. Temp. = temperatura, NTU (unidades nefolométricas de turbidez).

Día	Conc. Clo <i>a</i> $\mu\text{g L}^{-1}$	% de algas verdes	% de cianobacteri as	% de diatomeas	% de criptofitas
5-9-2002	96,8 \pm 6,5	0	100	0	0
8-10-2003	14,99 \pm 0,13	8,8	91,2	0	0
15-10-2003	15,64 \pm 0	19,0	57,4	21,4	0

Tabla 3. Concentración de clorofila *a* y porcentaje de cada grupo algal en el punto L2. Conc = concentración. Los porcentajes de cada alga se han determinado por técnicas fluorométricas.



Día	NID $\mu\text{g N L}^{-1}$	Fósforo $\mu\text{g P L}^{-1}$	Relación NID/P _{tot}
	Total (NO ₂ -,NO ₃ -,NH ₄ +) Total, Soluble	Total, Soluble	
1-9-2002	70 (ND, ND, 70)	162, nd	0,43
6-9-2002	396 (ND, ND, 396)	114, nd	3,4
12-9-2002	93 (ND, ND, 93)	218, nd	0,43
7-10-2002	197 (ND, 53, 116,7)	144, nd	1,18

Tabla 4. Nutrientes encontrados en el punto S2 en el año 2002. ND = No detectado, nd = no determinado.

Día	Temp. (°C)	Turbidez (NTU)	Conductivida d $\mu\text{S cm}^{-1}$	Oxígeno disuelto (mg L^{-1})	pH
1-9-2002	21,5 \pm 0,2	8,6 \pm 2,6	100 \pm 1	6,05 \pm 0,01	8,7 \pm 0,0
6-9-2002	19,6 \pm 0,1	17,4 \pm 1,8	100 \pm 1	5,25 \pm 0,16	7,3 \pm 0,0
12-9-2002	19,7 \pm 0,0	31,1 \pm 1,5	110 \pm 0	10,36 \pm 0,0	8,9 \pm 0,0
7-10-2002	17,4 \pm 0,3	14,89 \pm 1,4	90 \pm 1	8,94 \pm 0,07	8,28 \pm 0,0

Tabla 5. Datos fisico-químicos encontrados en el punto S2 en el año 2002 en el embalse de Santillana. Temp. = temperatura, NTU (unidades nefelométricas de turbidez)

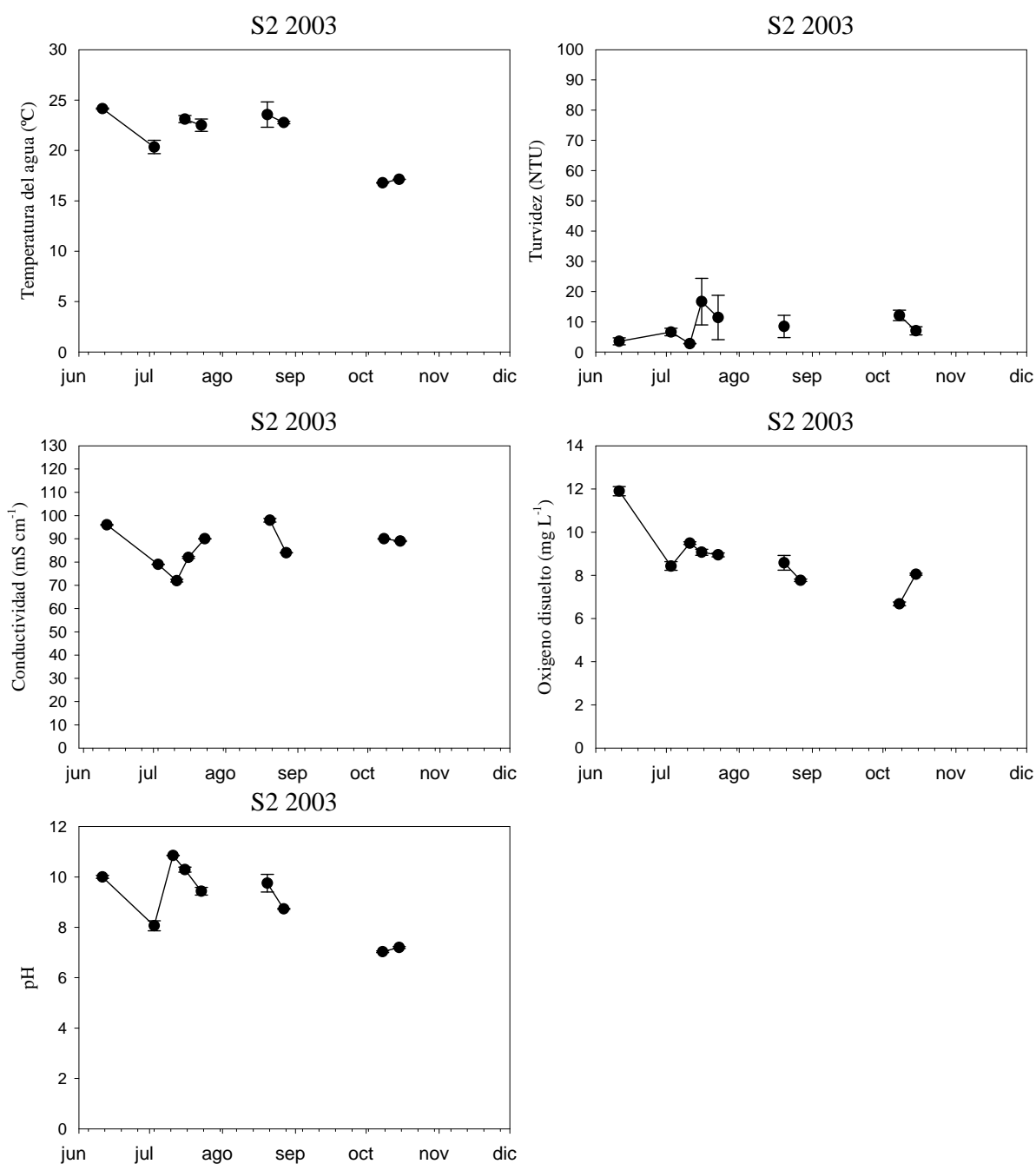


Figura 6. Variables físico-químicas analizadas en el embalse de Santillana. Se muestran la temperatura del agua, turbidez, conductividad, oxígeno disuelto y pH para el año 2002 y 2003.

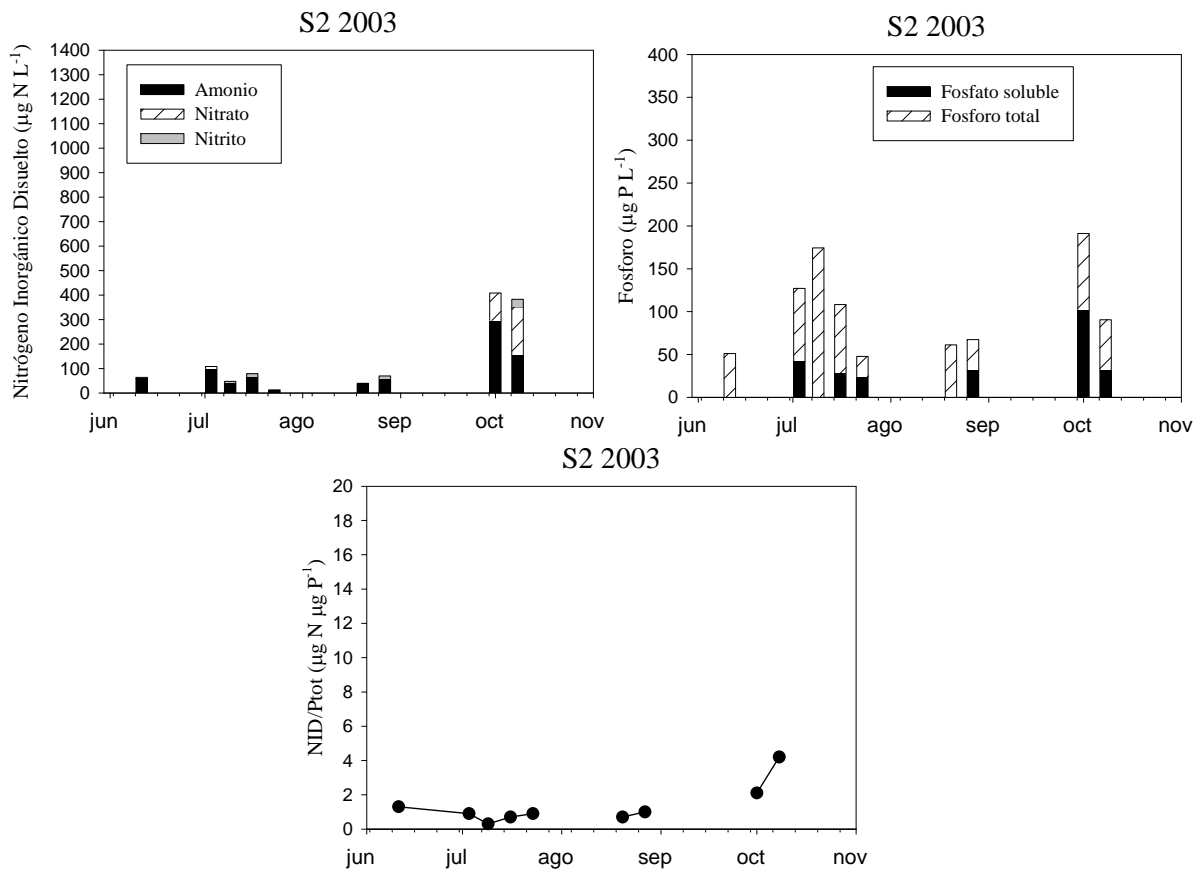


Figura 7. Concentraciones de nutrientes del punto S2 en el embalse de Santillana. Se muestran las concentraciones de nitrato, nitrito, amonio, fósforo total y relación NID/Ptot y fosfato soluble para el año 2003.

Día	Conc. Clo <i>a</i> $\mu\text{g L}^{-1}$	% de algas verdes	% de cianobacteri as	% de diatomeas	% de criptofitas
1-9-2002	$83,8 \pm 5,1$	$2,2 \pm 0,01$	$98,8 \pm 1,6$	0 ± 0	0 ± 0
6-9-2002	$59,0 \pm 3,8$	$22,8 \pm 8,2$	$77,2 \pm 8,2$	0 ± 0	0 ± 0
12-9-2002	$116,6 \pm 2,6$	ND	ND	ND	ND
7-10-2002	$79,30 \pm 1,32$	$34,8 \pm 3,7$	$0,4 \pm 0,7$	0 ± 0	$64,8 \pm 2,9$

Tabla 8. Concentración de clorofila *a* y porcentaje de cada grupo algal en el punto L2. Conc = concentración. ND = No Determinado

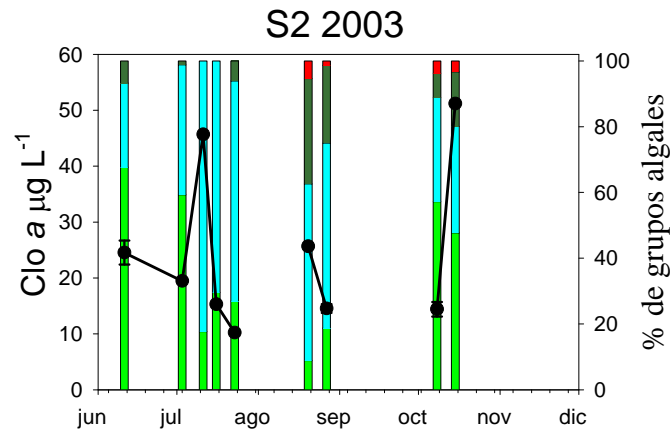


Figura 1. Concentraciones de clorofila *a* y porcentaje de grupos algales en el punto S2 del embalse de Santillana en el año 2003. Se muestran las concentraciones de clorofila determinadas mediante extracción metanólica y % de esa clorofila que pertenece a cada uno de los cuatro grupos algales (algas verdes (verde), cianobacterias (azul), diatomeas (marrón) y criptofitas (rojo)) determinada por métodos fluorométricos en barras.

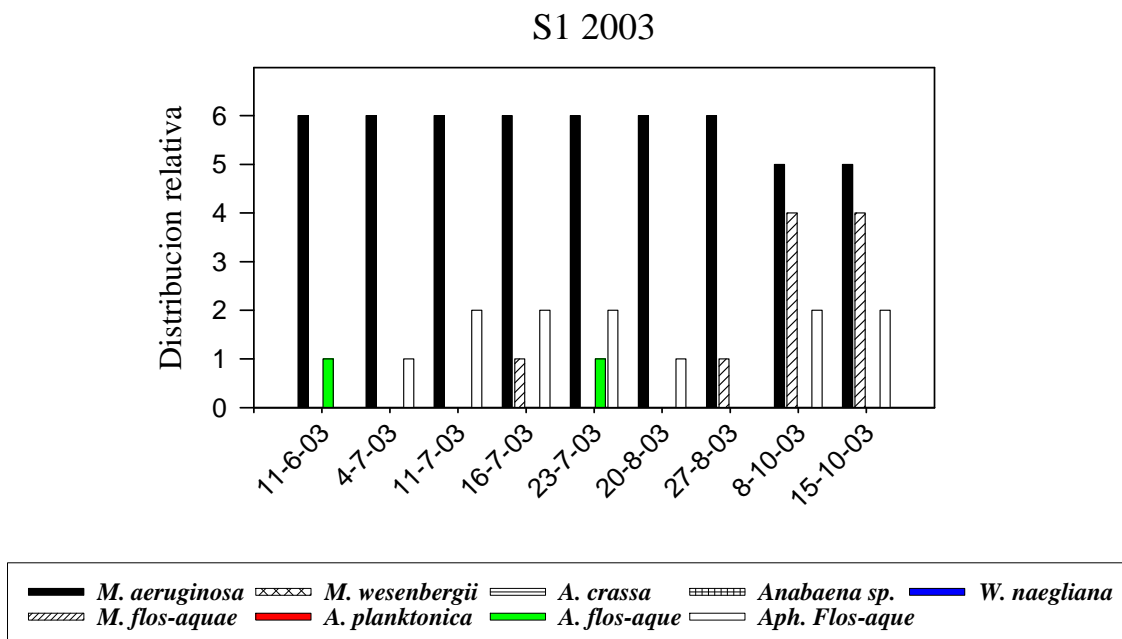


Figura 2. Distribución relativa de cianobacterias planctónicas presentes en el punto S2 en el año 2003.



Día	NID $\mu\text{g N L}^{-1}$	Fósforo $\mu\text{g P L}^{-1}$	Relación NID/Ptot
	Total (NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+)	Total, Soluble	
12-7-2002	50 (ND, ND, 50)	nd, nd	nd
27-7-2002	60 (ND, ND, 60)	nd, nd	nd
6-8-2002	43 (ND, ND, 43)	93,7, nd	0,45

Tabla 9. Nutrientes encontrados en el punto V2' en el año 2002. ND = No detectado, nd = no determinado.

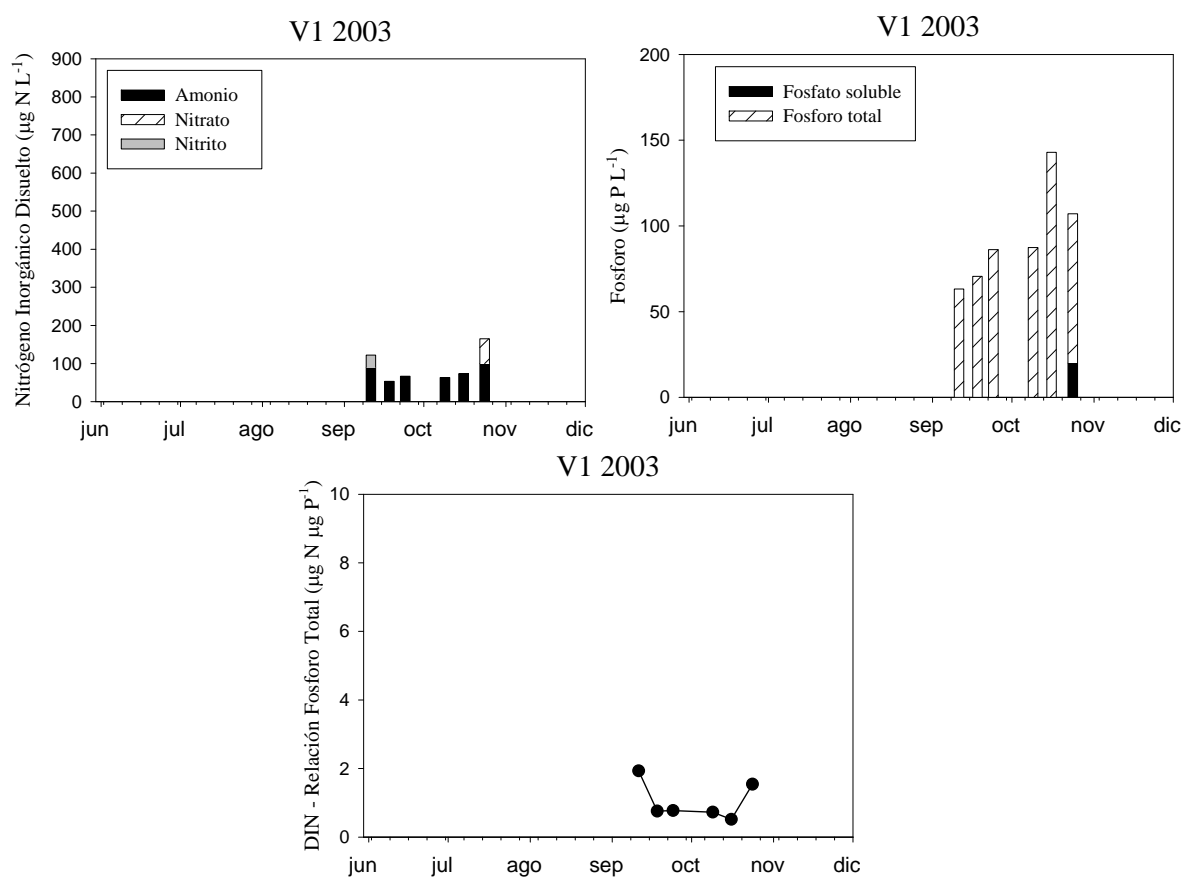


Figura 3. Concentraciones de nutrientes del punto V2 en el embalse de Valmayor. Se muestran las concentraciones de nitrato, nitrito, amonio, fósforo total y relación NID/Ptot y de fosfato soluble para el año 2003.



Día	Temp. (°C)	Turbidez (NTU)	Conductivida d $\mu\text{S cm}^{-1}$	Oxigeno disuelto (mg L^{-1})	pH
12-7-2002	$22,8 \pm 0,3$	$10,3 \pm 2,8$	120 ± 0	$10,02 \pm 0,1$	$9,8 \pm 0,0$
27-7-2002	$21,3 \pm 0,2$	$12,4 \pm 1,5$	140 ± 0	$10,5 \pm 0,35$	$10,4 \pm 0,0$
6-8-2002	$22,6 \pm 0,2$	$9,8 \pm 1,8$	120 ± 0	$8,53 \pm 0,15$	$10,13 \pm 0,0$

Tabla 10. Datos físico-químicos encontrados en el punto V2' en el año 2002 en el embalse de Santillana. Temp. = temperatura, NTU (unidades nefolométricas de turbidez).

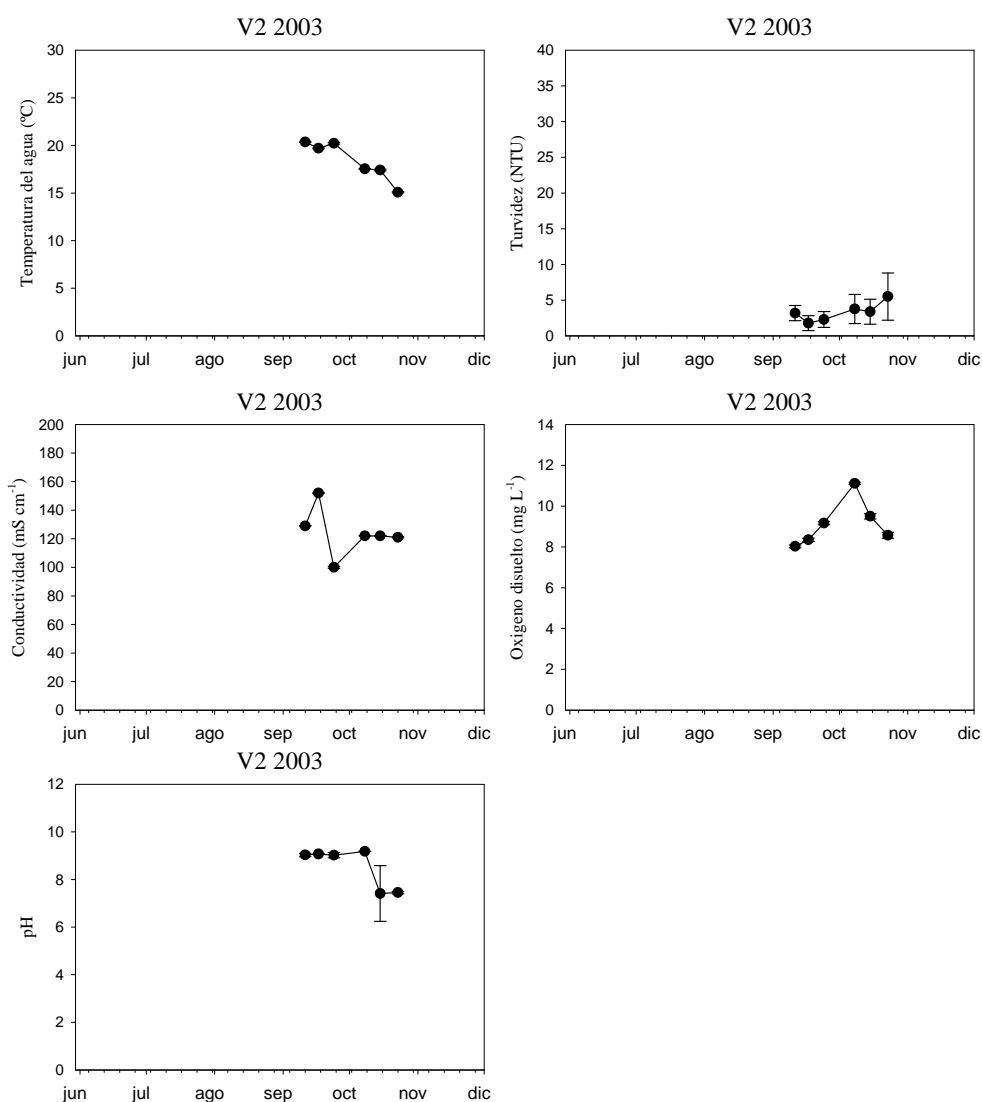


Figura 4. Concentraciones de nutrientes del punto V1 en el embalse de Valmayor. Se muestran las concentraciones de nitrato, nitrito, amonio, fósforo total y relación NID/Ptot y de fosfato soluble para el año 2003.



Día	Conc. Clo <i>a</i> $\mu\text{g L}^{-1}$	% de algas verdes	% de cianobacteri as	% de diatomeas	% de criptofitas
12-7-2002	$83,8 \pm 5,1$	$56,1 \pm 1,6$	$43,3 \pm 1,8$	0 ± 0	0 ± 0
27-7-2002	$59,0 \pm 3,8$	$71,9 \pm 0,3$	$28,0 \pm 0,3$	0 ± 0	0 ± 0
6-8-2002	$116,6 \pm 2,6$	$58,8 \pm 0,1$	$41,2 \pm 0,1$	0 ± 0	0 ± 0

Tabla I.11. Concentración de clorofila *a* y porcentaje de cada grupo algal en el en el embalse de Valmayor en el punto V2'. Conc = concentración.

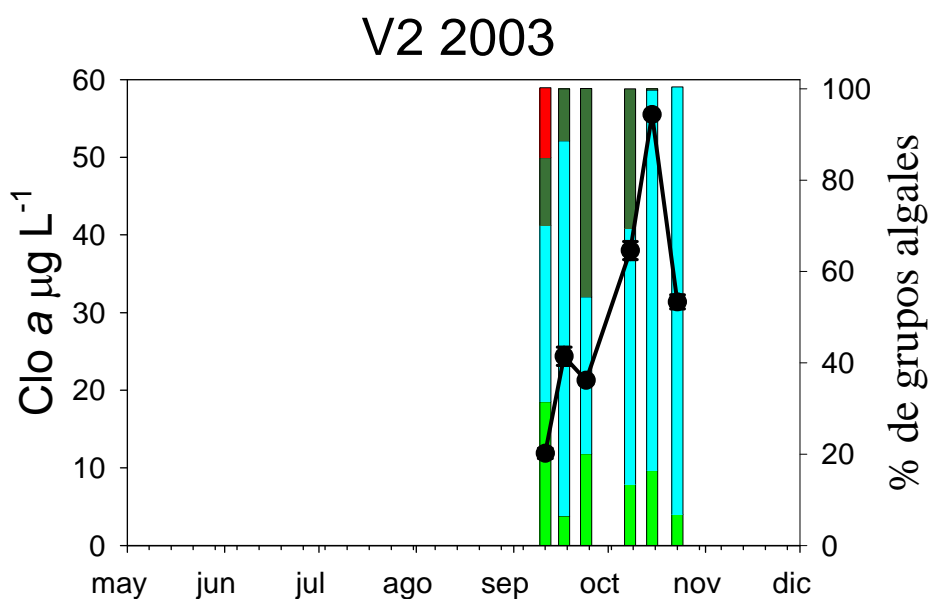


Figura 5. Concentraciones de clorofila *a* y porcentaje de grupos algales en el punto V2 del embalse de Valmayor en el año 2003. Se muestran las concentraciones de clorofila determinadas mediante extracción metanólica y % de esa clorofila que pertenece a cada uno de los cuatro grupos algales (algas verdes (verde), cianobacterias (azul), diatomeas (marrón) y criptofitas (rojo)) determinada por métodos fluorométricos.

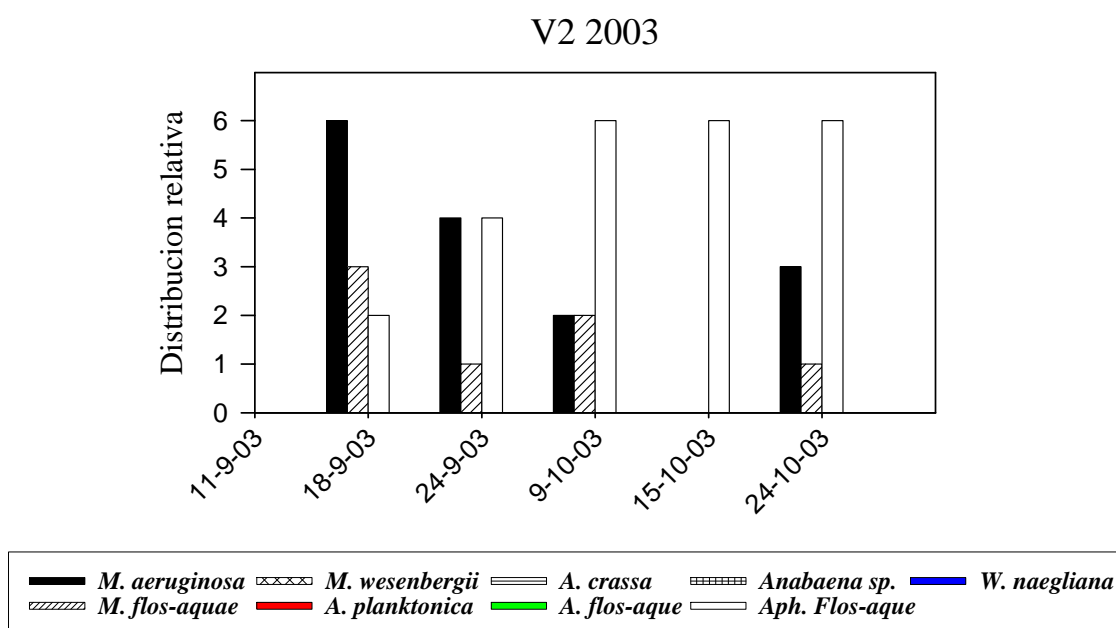


Figura 6. Distribución relativa de cianobacterias planctónicas presentes en el punto V2 en el año 2003.